

Solubilisierung lipophiler Substanzen durch Phospholipidvesikel

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften im Fachbereich Chemie
der Universität Gesamthochschule Essen

vorgelegt von

Erik Brückner

aus Marl

Essen im Jahre 2000

Referent: Prof. Dr. H. Rehage

Korreferent: Prof. Dr. G. Peschel

Tag der mündlichen Prüfung: 08.08.2000

Am Meer, am wüsten, nächtlichen Meer
steht ein Jüngling-Mann,
die Brust voll Wehmut, das Haupt voll Zweifel,
und mit düstern Lippen fragt er die Wogen:
"O löst mir das Rätsel des Lebens,
das qualvoll uralte Rätsel,
worüber schon manche Häupter gegrübelt,
Häupter in Hieroglyphenmützen,
Häupter in Turban und schwarzem Barett,
Perückenhäupter und tausend andre,
arme, schwitzende Menschenhäupter.
Sagt mir, was bedeutet der Mensch?
Woher ist er kommen? Wo geht er hin?"

Wer wohnt dort oben auf den goldenen Sternen?"
Es murmeln die Wogen ihr ew'ges Gemurmel,
es wehet der Wind, es fliehen die Wolken,
es blinken die Sterne gleichgültig und kalt.
Und ein Narr wartet auf Antwort.

Heinrich Heine

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von September 1996 bis Januar 2000 im Institut für Physikalische Chemie der Universität Gesamthochschule Essen im Rahmen eines interdisziplinären Graduiertenkollegs „Verbesserung des Wasserkreislaufs urbaner Gebiete zum Schutz von Boden und Grundwasser“ angefertigt. Mein besonderer Dank gilt

Herrn Prof. Dr. H. Rehage

für die interessante Themenstellung, die wertvollen Ratschläge während der Durchführung dieser Arbeit. Herrn Prof. Dr. G. Peschel danke ich recht herzlich für die Übernahme des Korreferates. Bei der Deutschen Forschungsgemeinschaft bedanke ich für die finanzielle Unterstützung in Form eines Stipendiums.

Allen Mitgliedern des Graduiertenkollegs möchte ich für die angenehme Atmosphäre, die Diskussionsbeiträge und die Möglichkeit des Einblicks in die unterschiedlichsten Interessengebiete der verschiedenen Fachbereiche danken. Für die Kooperation bei der Untersuchung der Vesikel/Zell-Interaktionen sei C. Ehrenstein und Prof. Dr. G. Obe besonders gedankt.

Ich danke allen Mitgliedern des Institutes für die Kollegialität, Hilfsbereitschaft und das ausgezeichnete Arbeitsklima. Mein besonderer Dank gilt Dr. P. Sonntag für die nahezu unzähligen Diskussionen, R. König für die ständige Hilfsbereitschaft und Dr. A. Walter für die unermüdlichen Lektorentätigkeiten. N. Wegen, I. Schneeweiß und H. Song danke ich für die tatkräftige Mithilfe zum Gelingen dieser Arbeit.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei Dr. U. Seifert und Dr. H.-G. Döbereiner (MPI Golm) für das ständige Interesse an dieser Arbeit und die interessanten Diskussionen bedanken. Ferner gilt mein Dank Dr. J. Hotz.

Besonders herzlich bedanken möchte ich mich bei meinen Eltern für ihre immerwährende Unterstützung und natürlich bei Dr. P. Meineke, deren Hilfsbereitschaft ich nicht in Worte zu fassen vermag.

Inhaltsverzeichnis

Einleitung	4
1 Grundlagen	4
1.1 Historischer Hintergrund.....	5
1.2 Phospholipide	5
1.3 Geometrische Betrachtung der Packung von Amphiphilen.....	6
1.4 Kräfte innerhalb der Doppelschicht	9
1.5 Dynamik der Doppelschichtstrukturen.....	9
1.6 Bedeutung der Selbstorganisation für die Funktion der Zelle	10
1.7 Polymorphismus der Phospholipide	11
1.8 Einteilung der Vesikel.....	14
1.9 Gestalt von Vesikeln.....	14
1.10 Stabilität von Vesikeln	16
1.11 Darstellung und Eigenschaften von Phospholipidvesikeln	17
1.12 Solubilisierung in Mizellen und Vesikeln.....	19
1.13 Anwendungsbeispiele vesikulärer Systeme.....	20
1.14 Verwendung von Vesikeln zur Solubilisierung lipophiler Substanzen.....	21
1.15 Problemstellung	22
Ergebnisse.....	23
2 Lokalisierung lipophiler Solubilisate innerhalb der Doppelschicht von Phospholipidvesikeln.....	23
2.1 Untersuchungsmethoden zur Lokalisierung des Solubilisats in Vesikeln.....	23
2.2 Protonenresonanzspektroskopie zur Charakterisierung der Packungseigenschaften innerhalb der Doppelschicht	23
2.3 Röntgendiffraktometrie zur Charakterisierung struktureller Einflüsse innerhalb der Doppelschicht	34
2.4 Fluoreszenzspektroskopie zur Untersuchung der inneren Eigenschaften der Doppelschicht	40
3 Thermotrope Eigenschaften von Vesikeln.....	47
3.1 Dynamische Differenzkalorimetrie	47
3.2 Einfluß des Phasenverhaltens auf die Morphologie von Vesikeln.....	61
3.3 Mikroskopische Untersuchung des thermotropen Polymorphismus.....	63
3.4 Zusammenfassung.....	66
4 Mechanochemische Eigenschaften von Phospholipidvesikeln.....	67
4.1 Elastische Eigenschaften amphiphiler Substanzen	67

4.2 Elastizität von Vesikeln.....	67
4.3 Bestimmung der Biegesteifigkeit	69
4.4 Methoden zur Bestimmung der Biegesteifigkeit.....	71
4.5 Optimierung der Methode der Fluktuationsanalyse.....	78
4.6 Numerische Simulationen.....	79
4.7 Fluktuationsanalyse von Vesikeln	96
4.8 Einfluß lipophiler Solubilisate auf die Biegesteifigkeit	103
4.9 Temperaturabhängige Formfluktuationsanalyse.....	109
4.10 Zusammenfassung	115
4.11 Bedeutung der Biegesteifigkeit von Vesikeln.....	115
5 Kinetische Untersuchungen zur Solubilisierung	118
5.1 Dynamik des Einbaus lipophiler Solubilisate in die Vesikelmembran	118
5.2 Kinetik der Solubilisierung lipophiler Substanzen.....	130
6 Einfluß von Vesikeln auf das mutagene Potential lipophiler Schadstoffe	138
6.1 Bedeutung von Vesikeln im Hinblick auf Mobilisierungserscheinungen.....	138
6.2 Fremdstoffmetabolismus lipophiler Stoffe in Organismen.....	138
6.3 Schwesterchromatidenaustausch-Test (SCE).....	139
6.4 Einfluß von Vesikeln auf die Gentoxizität.....	141
6.5 Zusammenfassung.....	151
7 Anwendungsbeispiele vesikulärer Systeme	152
7.1 Wege zu morphologisch schaltbaren vesikulären Strukturen.....	152
7.2 Vesikel als Templat zur Polymerisation.....	160
8 Zusammenfassung und Ausblick.....	172
8.1 Zusammenfassung.....	172
8.2 Ausblick.....	175
9 Material und Methoden.....	176
9.1 Reinigung der verwendeten Chemikalien	176
9.2 Methoden zur Vesikeldarstellung.....	176
9.3 Experimentelle und analytische Methoden	178
10 Literaturverzeichnis.....	190
11 Anhang	197

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzungen chemischer Substanzen

BrdUrd	5-Bromdesoxyuridin
BTX	Benzol, Toluol, Xylol
DLPC	Dilauroylphosphatidylcholin
DMPC	Dimyristoylphosphatidylcholin
DNS	Desoxyribonucleinsäure
DOPC	Dioleoylphosphatidylcholin
DPPC	Dipalmitoylphosphatidylcholin
DSPC	Distearoylphosphatidylcholin
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
SDS	Natriumdodecylsulfat

Begriffliche Abkürzungen

CHO	Ovar des chinesischen Hamsters
DSC	Dynamische Differenzkalorimetrie
GUV	Riesige unilamellare Vesikel
LUV	Große unilamellare Vesikel
MLV	Multilamellare Vesikel
ROI	Relevanter Bildausschnitt
SCE	Schwesterchromatidenaustausch
SUV	Kleine unilamellare Vesikel

Abkürzungen numerischer Faktoren und Konstanten

a	Platzbedarf eines Amphiphils
a_0	Optimale Fläche der polaren Kopfgruppe eines Amphiphils
a_l^m	Amplituden der Kugelfunktionen
A, A_0	Fläche, Ausgangsfläche
B_l	Theoretische Koeffizienten der Legendre-Polynome
c	Krümmung, reziproker Radius
c_0	Spontane Krümmung
C_p	Spezifische Wärmekapazität
d	Durchmesser,
d_l	Dicke der Doppelschicht
D	Diffusionskoeffizient
E	Energie
G, G^0	Gibbs-Energie, Standard Gibbs-Energie
H	Enthalpie, Standard Enthalpie
j	Permeationsrate
k	Boltzmann-Konstante
K	Gleichgewichtskonstante
k_c	Modul der Biegesteifigkeit
\bar{k}_c	Modul der Gauß'schen Krümmung
k_s	Modul der Dehnung
l	Quantenzahl, anguläres Moment
l_c	Kritische Länge der unpolaren Ketten eines Amphiphils
m	Quantenzahl
n	Lamellenzahl
n_{DMPC}	Stoffmenge DMPC
N	Laufende Nummer
p	Druck
P	Packungsparameter, Verteilungskoeffizient
P_l^m	Legendre Polynome
q	Modenzahl
r	Radius
r_0	Radius einer äquivalenten Sphäre
R	Allgemeine Gaskonstante
S, S^0	Entropie, Standard Entropie
t	Zeit
T	Temperatur

u	Relative Deformation
U_1	Term zur Ermittlung der Biegesteifigkeit
v	Volumen der unpolaren Ketten eines Amphiphils
V_{eff}	Effektives Volumen
X	Molenbruch
Y_l^m	Kugelfunktionen
a	Umsatzvariable
b	Isobarer thermischer Flächenausdehnungskoeffizient
b_{\perp}	Ausdehnungskoeffizienten des Membranquerschnitts
δ	Chemische Verschiebung
Δ	Dimensionsloser Flächenüberschuß
g	Grenzflächenspannung
g_v	Volumenausdehnung
h	Viskosität
h_c	Exponent
H	Mittlere Krümmung
j	Azimutwinkel
J	Polarwinkel
κ	Interaktionskonstante
K	Gauß'sche Krümmung
l	Wellenlänge
n_q	Amplituden der Konturfluktuation der Fouriertransformation
m	Chemisches Potential
q	Bragg-Winkel
s	Laterale Spannung
\bar{s}, s_{eff}	Effektive Membranspannung
t	Relaxationszeit
$x(g, t)$	Anguläre Autokorrelationsfunktion

Einleitung

1 Grundlagen

Das wissenschaftliche Interesse an Phospholipidvesikeln ist in den letzten 35 Jahren seit der Aufklärung der kolloidalen Struktur dieser Assoziationsaggregate immens gestiegen. Die Bedeutung der Vesikel erstreckt sich über eine Vielzahl von Forschungsgebieten beginnend bei den Kolloidwissenschaften [1,2], über die Biophysik [3] bis in den Bereich der Medizin [4].

Vesikel stellen aus wissenschaftlicher Sicht Minimalsysteme lebender Zellen dar und sind inzwischen zu einem wichtigen Hilfsmittel bei der Mimetik biologischer Membranen geworden. Sie dienen dem Studium von Permeationseigenschaften der Zellmembranen [5], von Funktionsweisen membrangebundener Enzyme [6,7], zellulärer Transportvorgänge [2] und der Stabilität sowie der Gestalt von Zellen [1].

Bereits realisierte sowie mögliche zukünftige Anwendungen von Vesikeln basieren auf den amphiphilen Eigenschaften und der hiermit verbundenen Möglichkeit zur Solubilisierung oder Verkapselung sowohl wasserunlöslicher als auch wasserlöslicher Substanzen und Wirkstoffe. Die Biokompatibilität und die geringe Toxizität der Phospholipide ermöglicht kosmetische und pharmazeutische Anwendungen. So hat sich der Begriff „Liposomen“ im Bereich der Kosmetika, dem zur Zeit bedeutendsten Einsatzgebiet der Phospholipide, als ein alltäglich gebräuchlicher Term etabliert. Die geringen allergenen Eigenschaften, aber auch das Eindringen und Verfrachten von Wirkstoffen in tiefer gelegene Hautschichten spielen hierbei eine besondere Rolle [8].

Nachdem der anfängliche Optimismus einer möglichen Verwendung von Vesikeln als „wirkstoffliefernde Systeme“ im Bereich der Medizin zunächst verebbte, sind mittlerweile Medikamente auf der Basis unilamellarer Liposomen auf dem Markt [9]. Die Applikation ist nicht nur durch Injektion des liposomalen Wirkstoffes in die Blutbahn möglich; hochflexible Vesikel, sogenannte Transfersomen, sind sogar in der Lage, den Wirkstoff über die Haut diffusiv in den Organismus einzubringen [10]. Eine Anwendung kationischer Vesikel findet sich in der Gentherapie. Synthetische Kationentenside ermöglichen in Anlehnung an virale Prozesse die sogenannte Transfektion, d.h. das Einschleusen von Erbmaterial in intakte Eukaryontenzellen [11].

Für industrielle Anwendungen werden zunehmend solche Tenside interessant, die als nachwachsender Rohstoff kostengünstig und leicht biologisch abbaubar sind. Aus diesem Grund finden sich potentielle Anwendungen der Phospholipide in der tertiären Erdölförderung [12], der Bodensanierung [13], sowie der Beseitigung von Öl auf Wasseroberflächen [14].

Phospholipide stellen den Hauptbestandteil natürlicher Zellmembranen dar und sind somit auf der Erdoberfläche ubiquitär verbreitet. Viele Wasseroberflächen weisen eine Monoschichtbelegung mit verschiedensten Lipiden auf.

Ferner ist in natürlicher Umgebung die Aggregation der Phospholipide zu sphärisch geschlossenen Doppelschichten, den Vesikeln oder Liposomen, möglich. Hierbei dienen sandige oder gesteinsreiche Oberflächen als Template zur Bildung der vesikulären Strukturen [15]. Über den Weg der Solubilisierung in der Doppelschicht von Vesikeln werden auf diese Weise potentielle, natürliche Mobilisierungspfade lipophiler Schadstoffe eröffnet.

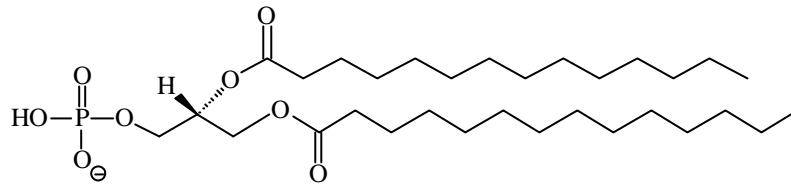
1.1 Historischer Hintergrund

Aus historischer Sicht läßt sich die Verwendung von Phospholipidvesikeln vermutlich auf einige tausend Jahre vor Christi Geburt datieren [15]. Die Verwendung von Lecithin aus Eigelb als Emulgator in Koch- und Backprozessen, zur Herstellung von Tinten oder als Waschmittel ist seit langer Zeit gängig. Obgleich viele dieser Anwendungen noch bis in die heutige Zeit gebräuchlich sind, erfolgte die detaillierte Aufklärung der Struktur von Vesikeln oder Liposomen erst im 20. Jahrhundert [16].

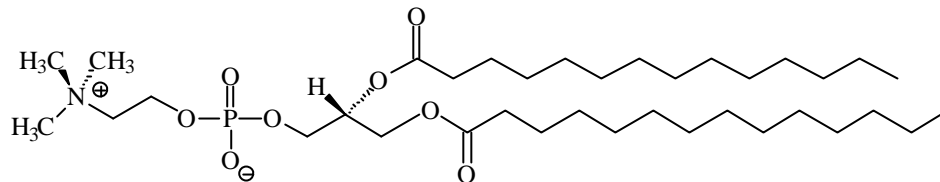
Phospholipide und insbesondere die Klasse der Phosphatidylcholine (Lecithine) wurden im Jahre 1846 von Goble als Fraktion des Eigelbs entdeckt. Der Name „lécithine“ stammt von der griechischen Bezeichnung „lekitos“ (λεκιθος) für Eigelb. Ein Hühnereigelb enthält etwa ein Gramm Lecithin. Die entsprechende Strukturformel konnte 1968 von Strecker aufgeklärt werden [15]. Virchow beschrieb erstmals 1854 das Quellverhalten von Lipiden in wäßriger Lösung [17], wobei die ersten optischen Abbildungen dieser „künstlichen Zellen“ von Lehmann auf das Jahr 1911 datiert werden [18]. Mit der detaillierten Aufklärung der kolloidalen Struktur von Vesikeln durch Alec Bangham im Jahre 1964 [16] wuchs das wissenschaftliche Interesse an Vesikeln enorm.

1.2 Phospholipide

Phospholipide bilden die Grundbausteine biologischer Membranen. Sie sind Derivate der Phosphatidsäure, einem Phosphorsäureester des 1,2-Diglycerids (Abbildung 1-1) und entstehen als Phosphatidylderivate durch Veresterung mit Ethanolamin, Cholin, Serin, Inosit, Glycerin oder Phosphatidylglycerin. Bei den natürlich vorkommenden Phospholipiden ist eine der beiden Fettsäuren mit geradzahligem Kohlenstoffzahl häufig ungesättigt und liegt in *cis*-Konfiguration vor.



Dimyristoylphosphatidsäure (DMPA)



Dimyristoylphosphatidylcholin (DMPC)

Abbildung 1-1: Strukturformel von Dimyristoylphosphatidsäure (DMPA) sowie vom zwitterionischen Dimyristoylphosphatidylcholin (DMPC).

Phospholipide weisen neben einer polaren, hydrophilen Kopfgruppe einen unpolaren lipophilen Molekülbereich auf. Aufgrund dieses amphiphilen Charakters zeigen die Moleküle eine deutliche Tendenz zur Anreicherung an Grenzflächen. Der ausgeprägte lipophile Acylbereich bedingt eine geringe Wasserlöslichkeit, so daß Phospholipide, die im wässrigen Medium dispergiert werden, zur spontanen Selbstorganisation neigen. Hierbei kommt es zur bevorzugten Aggregation in planaren Doppelschichten oder zur Bildung sphärisch geschlossener Doppelschichtstrukturen, den sogenannten Vesikeln oder Liposomen. Die treibende Kraft für diese Selbstorganisation ist die Minimierung der Kontaktzone zwischen der wässrigen Phase und der hydrophoben Region des Amphiphils.

1.3 Geometrische Betrachtung der Packung von Amphiphilen

Ein einfaches und doch wirkungsvolles Modell zur Vorhersage der Aggregationsform von Amphiphilen in wässriger Lösung ist die geometrische Betrachtung der Moleküle mit Hilfe des Packungsparameters P . Dieser wird definiert als

$$P = \frac{v}{a_0 \cdot l_c}, \quad (1.1)$$

mit dem effektiven Volumen v der unpolaren Ketten des Moleküls, der optimalen Fläche a_0 der polaren Kopfgruppe, bei welcher das chemische Potential μ^0 minimal ist und der kritischen Länge l_c der unpolaren Ketten (Abbildung 1-2). Letztere ist ein semiempirischer Parameter, wobei l_c im fluiden Zustand aufgrund des Vorliegens von gauche-Konformeren gemäß Tanford [19] um etwa einen Faktor 0.7 kleiner als die Länge der voll ausgestreckten Kette l_{\max} mit n Methylengruppen ist.

Allgemein gilt [20]

$$l_c \leq l_{\max} \approx (0.1265 n + 0.154) \text{ nm} \quad (1.2)$$

sowie

$$v \approx (26.9 n + 27.4) \cdot 10^{-3} \text{ nm}^3. \quad (1.3)$$

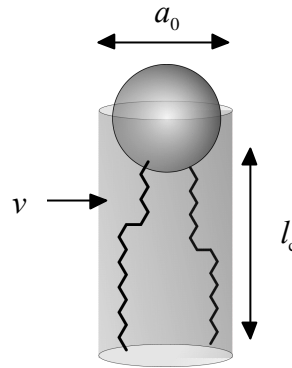


Abbildung 1-2: Modell zur Beschreibung des dimensionslosen Packungsparameters P eines Amphiphils (Erläuterungen im Text). Die Struktur des Moleküls ist vereinfacht durch einen polaren Kopf und zwei unpolare Paraffinketten wiedergegeben.

Ein Amphiphil weist eine „vorgeprägte“ Form auf und unterliegt bei der Aggregatbildung gewissen geometrischen Zwängen. Theoretisch ist eine Vielzahl verschiedener Aggregatformen möglich, wobei jedoch entropisch diejenige Struktur mit der kleinsten Zahl aggregierter Moleküle bei gegebener Geometrie bevorzugt wird. Kleinere Strukturen hingegen bedingen eine Abweichung von der optimalen Fläche der polaren Kopfgruppe a_0 und sind somit energetisch ungünstig.

Für Amphiphile, die in einer Mizelle mit dem Radius r und der Aggregationszahl M aggregieren, gilt folglich aus geometrischen Gesichtspunkten

$$M = \frac{4pr^2}{a_0} = \frac{4pr^3}{3v}. \quad (1.4)$$

Da der Mizellradius $r = 3v/a_0$ die kritische Länge l_c nicht überschreiten kann, gilt die Beziehung

$$\frac{v}{a_0 \cdot l_c} < \frac{1}{3}. \quad (1.5)$$

Einkettige Tenside wie beispielsweise Lysolipide sowie kurzkettige Phospholipide weisen einen großen Kopfbereich im Vergleich zum unpolaren Teil auf ($v < a_0 \cdot l_c$), so daß diese in Form sphärischer ($P < 1/3$) oder stäbchenförmiger Mizellen ($1/3 < P < 1/2$) aggregieren. Im Falle zweikettiger Phospholipide gilt $v \approx a_0 \cdot l_c$ und folglich sind Lamellen, Diskenmizellen oder große Vesikel (vgl. Abbildung 1-3) die bevorzugten Aggregationsformen ($P \approx 1$). Lipide mit sehr kleinen Kopfgruppen oder einem sehr ausgeprägten lipophilen Bereich können ferner inverse Strukturen ($P > 1$) ausbilden.

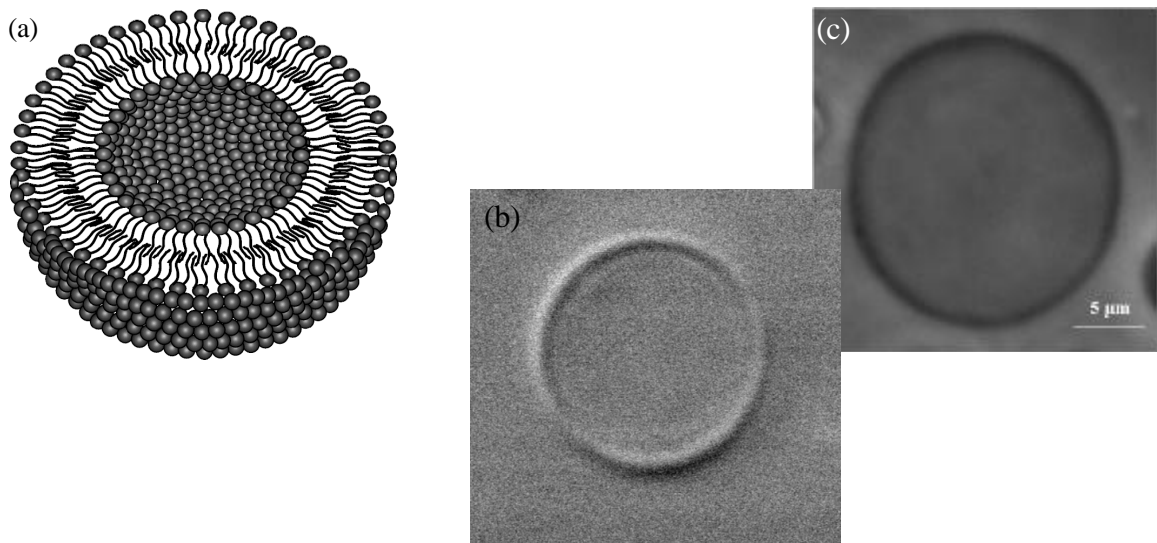


Abbildung 1-3: (a) Schematische Darstellung eines unilamellaren Vesikels als Schnitt durch die dreidimensionale Struktur. Die geschlossene Doppelschicht umschließt als dünne Membran ($d = 3 - 5 \text{ nm}$) ein inneres wäßriges Kompartiment. Vesikel können im Gegensatz zu Mizellen in Größenordnungen dargestellt werden, die für videomikroskopische Untersuchungen zugänglich sind. Mikroskopische Aufnahmen unilamellarer DMPC-Vesikel unter Verwendung eines differentiellen Interferenzkontrastes (b) und eines Phasenkontrastes (c).

1.3.1 Faktoren, welche den Packungsparameter der Phospholipide beeinflussen

Faktoren wie Temperaturänderungen, pH-Wert oder Ionenkonzentrationen können den Packungsparameter P von Phospholipiden und resultierend die Aggregatform der Amphiphile beeinflussen. Aber auch die Einlagerung kleiner organischer Moleküle wie kurzkettige Alkane bewirkt durch Erhöhung des effektiven Volumens v des lipophilen Bereichs eine Änderung des Packungsparameters und führt zur Bildung größerer Vesikel oder inverser Aggregate [21].

1.4 Kräfte innerhalb der Doppelschicht

Das Konzept der geometrischen Betrachtung der Packung von Amphiphilen ist sehr vereinfacht. Es vernachlässigt attraktive und repulsive Kräfte innerhalb der Doppelschicht, die in unterschiedlicher Entfernung von der Grenzfläche zur wässrigen Phase ansetzen (Abbildung 1-4) und zur Energie des Systems beitragen.

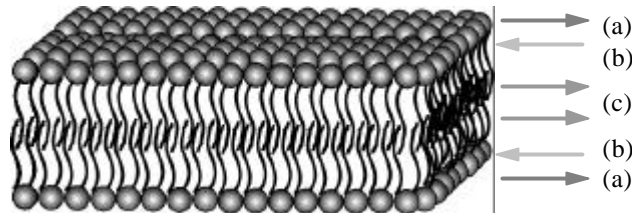


Abbildung 1-4: Schematische Darstellung der Kräfte innerhalb einer Lipiddoppelschicht, welche die Packungseigenschaften der Amphiphile beeinflussen [20]: Die Grenzflächenspannung (b) wirkt als attraktive Kraft an der Grenzfläche zwischen Wasser und den Kohlenwasserstoffketten. Die abstoßende Kraft der Kopfgruppen (a) ist hingegen oberhalb dieser Grenzfläche wirksam. Im lipophilen Bereich resultiert in fluiden Membranen aufgrund der eingeschränkten Freiheit der lipophilen Ketten weiterhin ein lateraler Druck (c).

Da die lipophilen Ketten der fluiden Doppelschicht nicht vollständig ausgestreckt vorliegen ($l_c \approx 0.7 \cdot l_{\max}$) resultiert ebenfalls ein lateraler Druck im lipophilen Bereich der Doppelschicht. Dieser tritt bei einer Doppelschicht der Dicke d_l in einer gewissen Entfernung D von der eigentlichen Grenzfläche auf und ist von der Krümmung r abhängig. Mit k_c der Biegesteifigkeit gilt vereinfacht [21]

$$\Delta E = \frac{2gd_l D}{r^2} = \frac{k_c}{2r^2}. \quad (1.6)$$

Die Grenzflächenspannung g von Vesikeln liegt im Bereich von $g = 20 - 50 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$ [20].

1.5 Dynamik der Doppelschichtstrukturen

Der ausgedehnte lipophile Bereich von Phospholipidmolekülen wie Dimyristoylphosphatidylcholin bedingt eine bevorzugte Aggregation in Form lamellarer Phasen oder vesikulärer Strukturen und beeinflusst überdies die statischen und dynamischen Eigenschaften der Aggregate. Die Ausbildung von Doppelschichten erfolgt in wässrigem Medium bereits bei Konzentrationen im Bereich von $1 \cdot 10^{-10} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, in Konzentrationen deutlich unterhalb der kritischen Mizellbildungskonzentration (cmc) einkettiger Tenside ($cmc \approx 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$). Die Aufenthaltsdauer t_R der Monomeren liegt in mizellaren Strukturen bei etwa $1 \cdot 10^{-4} \text{ s}$. Die Amphiphile stehen somit in ständigem Gleichgewicht mit

der umgebenden wässrigen Phase und die Aggregate sind kinetisch instabil. In Doppelschichtstrukturen erfolgt dieser Austausch bei einer Aufenthaltsdauer im Bereich $t_R = 1 \cdot 10^4$ s wesentlich langsamer. Vesikel sind daher im Gegensatz zu Mizellen stabil bei Verdünnung der umgebenden Lösung. Überdies ist der transversale Austausch von Phospholipidmolekülen von einer Monoschicht zur anderen, der sogenannte „Flip-Flop“, möglich. Der Flip-Flop ist jedoch ein langsamer Vorgang ($10^2 - 10^5$ s), der mit einem hohen energetischen Aufwand verbunden ist und wesentlich von der Natur der Kopfgruppe beeinflusst wird. Dies liegt darin begründet, daß die Lipidmoleküle beim Austausch den hydrophoben Membranbereich mit ihrer polaren Kopfgruppe durchdringen müssen [22]. Die laterale Beweglichkeit der Phospholipide ist in der Ebene fluider Doppelschichten vergleichsweise hoch: Ein Molekül legt in einer Sekunde die Strecke von 1 μm zurück [23].

Die Doppelschicht von Vesikeln weist eine Dicke von weniger als 5 nm auf. Sie stellt somit ein dünnes und extrem weiches Material mit molekularen Dimensionen dar. Diese Weichheit manifestiert sich in der geringen Biegesteifigkeit, die dazu führt, daß lamellare Phasen und Vesikel thermisch angeregte Fluktuationen, sogenannte Undulationen zeigen. Die Membranen unterliegen einer ständigen Auslenkung aus ihrer Gleichgewichtslage, ein Phänomen, das in Kapitel 4 ausführlich diskutiert wird.

Neben der extremen Weichheit ist die Doppelschicht von Vesikeln sehr stabil und bildet eine mechanische, chemische wie auch eine elektrische Barriere zwischen dem eingeschlossenen inneren Kompartiment und der äußeren wässrigen Phase.

1.6 Bedeutung der Selbstorganisation für die Funktion der Zelle

Phospholipide sind als Hauptbestandteil natürlicher Zellmembranen der Grundbaustein für das zelluläre Leben in all seiner Komplexität. Die geschlossene Doppelschichtstruktur schafft die Voraussetzung für eine funktionelle Kompartimentierung unter Abgrenzung des umgebenden Milieus (vgl. Abbildung 1-5). Sie gewährleistet selektive Permeabilitäten und den geordneten, separaten Ablauf einer Vielzahl spezifischer enzymatischer Reaktionen. In Form eines zweidimensionalen Lösungsmittel fungiert die Doppelschicht als Matrix zur Ein- und Anlagerung von Proteinen, Enzymen, signalübertragenden Molekülen und dem stabilisierenden Cytoskelett. Liposomen, winzige Pendants der Zellen, sorgen ferner als schützende Hülle für den intra- und interzellulären Transport von Makromolekülen.

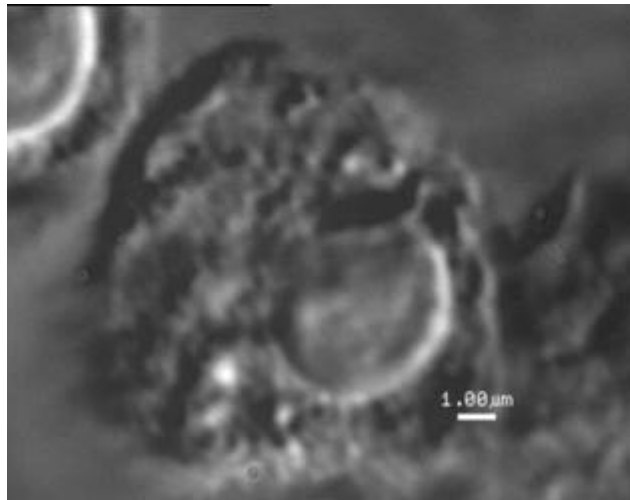


Abbildung 1-5: Mikroskopische Aufnahme einer Alveolar-Makrophage der Ratte. Die gesamte Zelle wird von einer Plasmamembran umgeben, die das Cytosol vom äußeren Medium abgrenzt. Im Zellinnern ist die Kernhülle sowie einzelne Zellorganellen zu erkennen.

Die Lipidmembran weist interessante elastische Eigenschaften auf. Sie ist als weiches Material leicht zu biegen, jedoch vergleichsweise schwer zu dehnen. Dies erlaubt beispielsweise den Erythrocyten, die im Blutkreislauf migrieren, über hunderte von Kilometern durch die engen Kapillaren der Blutgefäße zu gelangen, ohne dabei einen Verlust an Ionen zu erleiden.

1.7 Polymorphismus der Phospholipide

Diacylphosphatidylcholine langkettiger Fettsäuren sind in Wasser nahezu unlöslich. Die Dispersion von Phospholipiden in wäßriger Lösung führt zur Ausbildung typischer Doppelschichtstrukturen. Diese weisen ein ausgeprägtes Phasen- und Strukturverhalten in Form eines lyotropen sowie thermotropen Polymorphismus auf.

1.7.1 Lyotroper Polymorphismus

Reine Phospholipide liegen aufgrund ihres hygroskopischen Charakters in der Regel in Form von Monohydraten vor (Abbildung 1-6). Die Temperatur der Hauptumwandlung zur L_a -Phase sinkt mit steigendem Wasseranteil bis zur vollständigen Hydratisierung der Kopfgruppe des Amphiphils. Eine weitere Erhöhung des Wasseranteils führt oberhalb eines Wasseranteils von 33 Gew.-% zur Bildung eines heterogenen Zweiphasengebietes. In diesem Bereich koexistieren vollständig hydratisierte, parallel angeordnete Stapel lamellarer Phasen (vergleichbar den smektischen Phasen) und eine Wasserphase. Bei weiterer Verdünnung wird die Bildung sphärisch geschlossener Doppelschichtmembranen, sogenannter Vesikel, möglich.

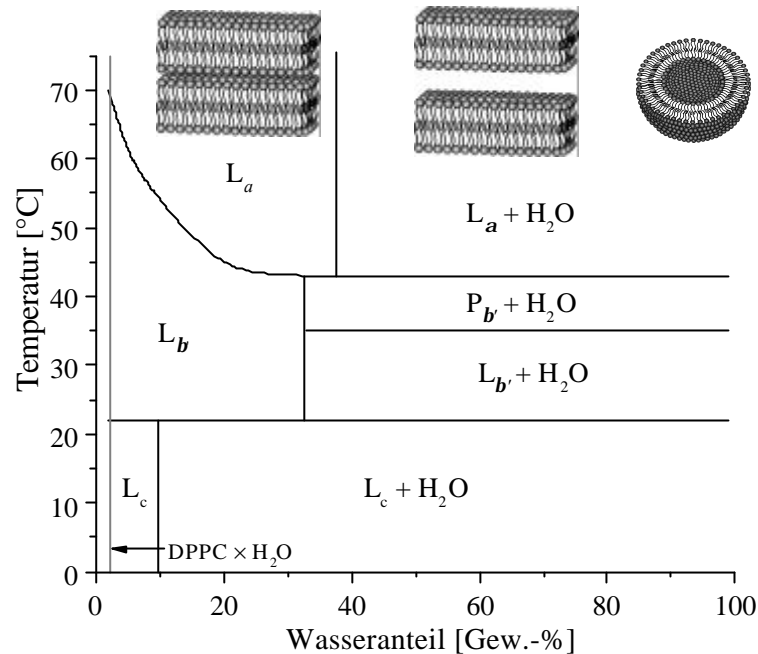


Abbildung 1-6: Vereinfachtes binäres Zustandsdiagramm des Systems 1,2-Dipalmitoylphosphatidylcholin/Wasser zur Erläuterung des thermotropen sowie lyotropen Polymorphismus [24]. Die Klassifikation der einzelnen Phasen der Phospholipide im Phasendiagramm erfolgt gemäß der Nomenklatur nach Luzatti durch Kennzeichnung der Überstruktur durch einen entsprechenden Großbuchstaben. Die Art der Packung der Kohlenwasserstoffketten, welche die Strukturbildung maßgeblich beeinflusst, wird in Form von Indices angehängt. Im System Dipalmitoylphosphatidylcholin/Wasser kann im wesentlichen zwischen vier Phasen, unterschieden werden. L_c kennzeichnet eine kristalline Phase, L_b und P_b repräsentieren jeweils Gelphasen sowie L_a die flüssig-kristalline Phase.

1.7.2 Thermotroper Polymorphismus

Im Bereich niedriger Temperaturen dominiert der hohe Ordnungsgrad der nahezu vollständig gestreckten, parallel angeordneten Acylreste und ermöglicht ein Maximum an van-der-Waals-Wechselwirkungen. Die Anordnung der Methylengruppen entspricht der energetisch günstigen all-trans-Konformation. In der hochgeordneten kristallinen L_c -Phase sowie der L_b -Phase liegen die Ketten in einer orthorhombischen bzw. gestört orthorhombischen Packung vor. Die Kopfgruppen sind innerhalb der L_c -Phase relativ immobil und nur unvollständig hydratisiert [25]. Mit steigender Temperatur erfolgt die Subgel-Umwandlung in die L_b -Phase unter Anstieg der Mobilität der Kopfgruppe. Hierdurch dringt verstärkt Wasser in den Bereich der Grenzflächen ein. Die Ketten weisen in der L_b -Phase eine Neigung von etwa 30° zur Ebene der Doppelschicht auf. Die Oberflächentexturen der L_b -, aber auch insbesondere der P_b -Phase, der sogenannten Ripple-Phase, sind mit Hilfe elektronenmikroskopischer Techniken visualisierbar [23]. In der P_b -Phase liegen die Acylketten in einem

gestörten hexagonalen Gitter mit einer Gitterkonstante von $a = 0.42 \text{ nm}$ vor und weisen wiederum jeweils eine Neigung von etwa 30° zur lokalen Ebene der Doppelschicht auf [26]. Die Doppelschicht weicht in die dritte Dimension unter Bildung regelmäßiger wellenförmiger Texturen konstanter Abstände von 25 nm aus (vgl. Abbildung 1-7). Weiterhin zeigen die Amphiphilmoleküle Rotationen um die Längsachse.

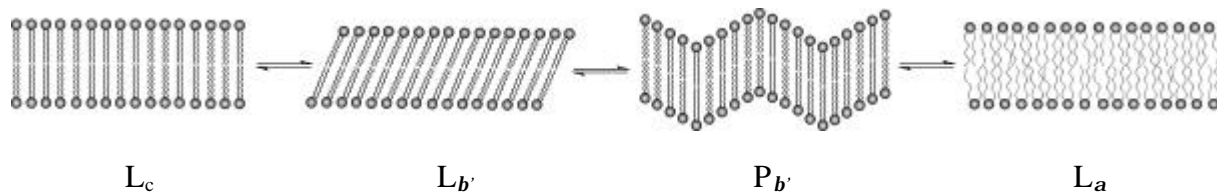


Abbildung 1-7: Schematische Anordnung der Diacylphosphatidylcholine innerhalb der Doppelschicht der verschiedenen thermotropen mesomorphen Phasen entsprechend steigender Temperatur.

Oberhalb der charakteristischen Hauptumwandlungstemperatur T_m erfolgt die Hauptumwandlung in die ungeordnete, flüssig-kristalline L_a -Phase. Kooperatives Schmelzen der Acylketten führt zur trans-gauche-Isomerisierung und zu einer schnellen lateralen Diffusion ($D \approx 1 \cdot 10^{-8} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$), sowie zu einer Rotation der Lipidmoleküle unter deutlicher Zunahme der Fluidität der Doppelschicht. Die Bildung der energetisch angeregten Rotationsisomere bewirkt eine laterale Ausdehnung, sowie eine vertikale Stauchung der Membran. Die Vesikelmembran ist mit Hilfe der Videomikroskopie visualisierbar, so daß die laterale Ausdehnung der Doppelschicht unter Verwendung riesiger Vesikel mikroskopisch beobachtet werden kann (vgl. Abbildung 1-8).

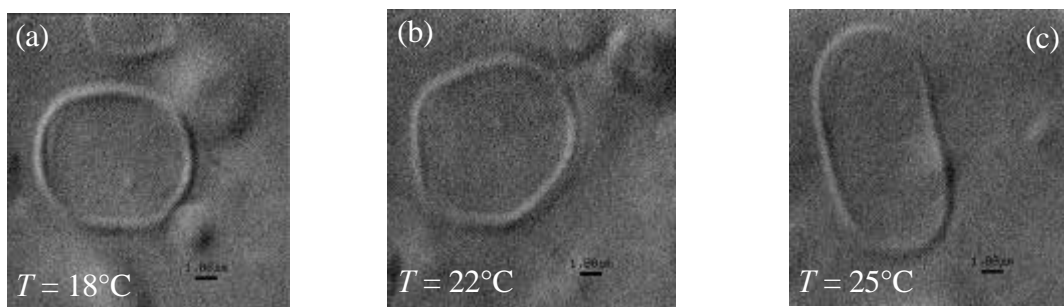


Abbildung 1-8: Mikroskopische Untersuchung der Phasenumwandlung eines unilamellaren DMPC-Vesikels. In der L_b -Phase (a) weist das Vesikel typischerweise polyhedrale Anordnungen auf, da die geneigten Doppelschichten nicht in Form einer Sphäre gepackt werden können. Durch Erhöhung der Temperatur erfolgt die kontinuierliche Umwandlung in die flüssig-kristalline L_α -Phase (c). Die Bildfolgen verdeutlichen die Zunahme der Membranfläche unter Ausbildung einer elliptischen Struktur.

Die Packung der Amphiphile ist in der fluiden Phase weniger kompakt, so daß das Solubilisierungsvermögen für kleine lipophile Moleküle ansteigt. Wasser dringt vermehrt in die fluide Doppelschicht ein und die Grenze zwischen polarer und unpolarer Region der Doppelschicht wird zunehmend diffuser [23].

1.8 Einteilung der Vesikel

Vesikel können anhand der Lamellenzahl und der Vesikelgröße charakterisiert werden (Tabelle 1-1), Eigenschaften, die stark von den Präparationsbedingungen abhängen. Hinsichtlich der Anzahl der Doppelschichten unterscheidet man zwischen unilamellaren und multilamellaren Vesikeln. Während unilamellare Vesikel relativ gut theoretisch charakterisiert sind, ist über multilamellare Systeme aufgrund ihrer Komplexität wenig bekannt.

Tabelle 1-1: Klassifizierung unilamellarer Vesikel nach der Größe.

Unilamellare Vesikel	Größe [μm]
Kleine unilamellare Vesikel (SUV)	0.02 - 0.1
Große unilamellare Vesikel (LUV)	0.1 - 1.0
Riesige unilamellare Vesikel (GUV)	> 1.0

1.9 Gestalt von Vesikeln

Präparationen riesiger Vesikel führen zu einer enormen Vielfalt unterschiedlichster Vesikel in Form und Gestalt. Diese Vielfalt inspiriert sowohl die theoretische, als auch die experimentelle Wissenschaft, nicht zuletzt, da Vesikel als Minimalmodelle für biologische Zellen angesehen werden können. Sie dienen dem Verständnis natürlicher Phänomene und letztendlich der Aufklärung von Ursachen verschiedenster Krankheiten. Insbesondere Gestaltänderungen spielen eine wichtige Rolle im Verständnis der Zelltopologie bei einer Vielzahl zellulärer Prozesse wie beispielsweise der Endo- oder Exocytose.

Die eigentliche Gestalt von Vesikeln kann theoretisch durch Minimierung der Krümmungsenergie bei konstanter Membranfläche A und innerem Volumen V erhalten werden. Ferner können die einzelnen Monoschichten eine unterschiedliche Anzahl an Molekülen aufweisen, so daß eine Flächendifferenz ΔA der inneren Monoschicht A_i und der äußeren Monoschicht A_a mit $\Delta A = A_a - A_i$ berücksichtigt werden muß. Auf dieser Grundlage ist es möglich, „Gestalt-Phasendiagramme“ der Vesikel zu berechnen, die für Einkomponentensysteme gut mit den experimentellen Beobachtungen der Phasenkontrastmikroskopie übereinstimmen [3].

Auf dieser Basis wird es möglich, Gestaltänderungen von Vesikeln, wie sie beispielsweise bei Erhöhung der Temperatur auftreten, zu beschreiben. Die Erhöhung der Temperatur bedingt eine laterale Ausdehnung der Doppelschicht unter Zunahme der Membranfläche A , wobei das eingeschlossene Volumen aufgrund des vergleichbar geringeren thermischen Ausdehnungskoeffizienten von Wasser nahezu konstant bleibt. Ausgehend von einer sphärischen Vesikelgestalt, die bei gegebener Membranfläche ein maximales Volumen einschließt, führt die Erhöhung der Temperatur zu einer elliptischen Deformation unter Ausbildung einer Diskocyte, entsprechend der Gestalt von roten Blutkörperchen. Wird die Möglichkeit einer unterschiedlichen Anzahl an Lipidmolekülen in den einzelnen Monoschichten der Doppelschicht berücksichtigt, so folgt aus der geringfügig unterschiedlichen thermischen Ausdehnung der einzelnen Monoschichten (analog einem Bimetall) eine Vielzahl möglicher Vesikelgestalten (vgl. Abbildung 1-9).

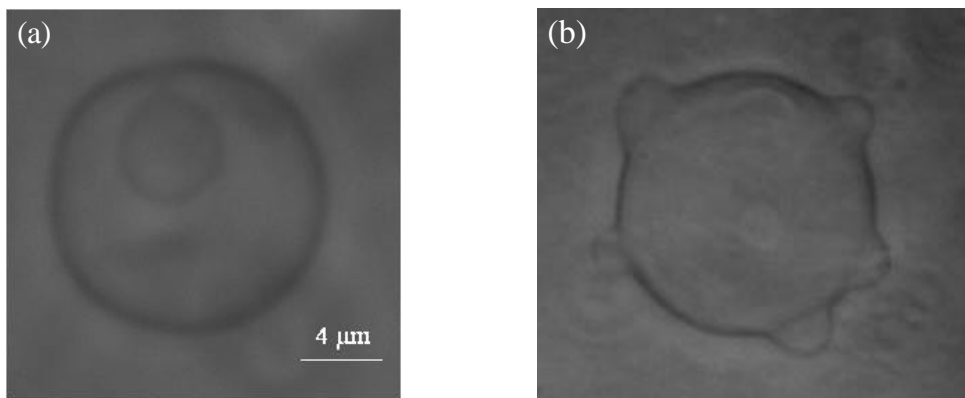


Abbildung 1-9: Unterschiedliche Gestalt unilamellarer DMPC-Vesikel: (a) Stomatocyte, (b) Echinocyte.

Die Symmetrie der Doppelschicht kann ebenfalls durch Induktion einer Krümmung aufgrund eines unsymmetrischen Einbaus von Fremdmolekülen oder durch unterschiedliche an die Membran angrenzende Medien gebrochen werden. Die theoretischen Modelle beschreiben jedoch nur „ideales“ Verhalten von Vesikeln. Das Verhalten „realer“ Vesikel wird dagegen oftmals durch Membrandefekte oder Inhomogenitäten in der Zusammensetzung diktiert und führt zu ungewöhnlichen Formen (Abbildung 1-10).

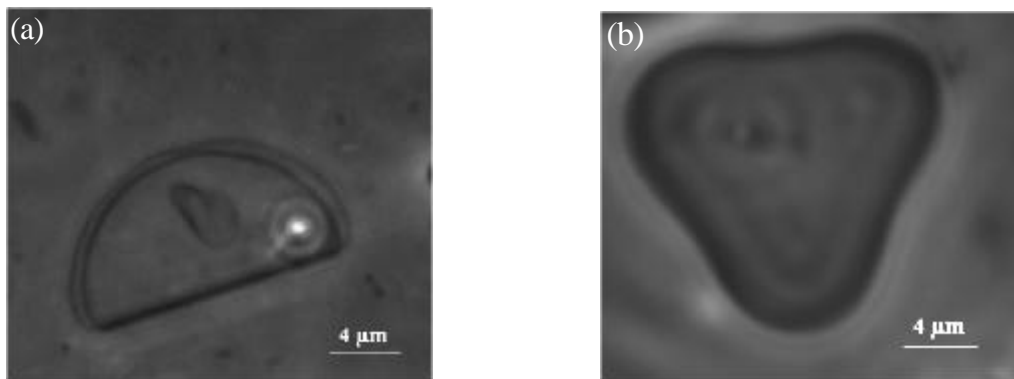


Abbildung 1-10: „Ungewöhnliche“ Vesikelgestalten von DMPC nach Solubilisierung lipophiler Substanzen wie (a) Hexadekan oder (b) Styrol.

1.10 Stabilität von Vesikeln

Vesikel befinden sich aus energetischer Sicht in einem metastabilen Zustand. Die günstigste Anordnung der Doppelschicht sollte planar sein. Kommt es jedoch bei der Quellung lamellarer Phasen zu einem Kontakt des hydrophoben Bereichs am Rand der Schicht mit der wäßrigen Umgebung, so schließt sich die Doppelschicht unter Ausbildung eines Vesikels [2]. Die resultierende sphärisch geschlossene Struktur mit einer Biegesteifigkeit $k_c > 0$ entspricht somit keinem thermodynamisch stabilen Zustand. Entropische Beiträge zur freien Energie eines Vesikels liegen in der Größenordnung von kT und sind im allgemeinen verglichen zur Krümmungsenergie mit 10 - 100 kT klein. Ein Vesikel ist somit in einer relativ stabilen Struktur „gefangen“. In der Praxis sind Vesikel in der fluiden Phase über einen Zeitraum einiger Monate bis hin zu Jahren stabil.

Wird die Fläche riesiger unilamellarer Vesikel um mehr als $\Delta A/A = 5 - 10 \%$ entsprechend einer Temperaturerhöhung von 10 - 15°C erhöht, so wird die Membran instabil und öffnet sich. Die Energie E_P zur Erzeugung einer Pore mit dem Radius r_P in einer Membran ist durch die auftretenden Randwechselwirkungen und der hiermit verbundenen Grenzflächenspannung g_P gegeben nach

$$E_P = 2pr_Pg_P. \quad (1.7)$$

Der Energiebetrag E_P ist im allgemeinen groß, so daß einmal entstandene Löcher in der Membran sich relativ schnell schließen. Entropisch stabilisierte Vesikel sind im Falle einer sehr geringen Biegesteifigkeit k_c möglich, d.h. falls $8pk_c \sim kT$ ist. Im Falle geringer Randwechselwirkungen g_P ($2pr_Pg_P \sim kT$) können offene Doppelschichtfragmente entstehen (vgl. Abbildung 1-11).

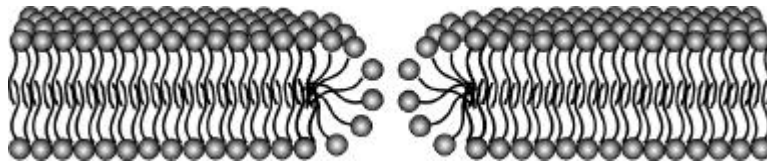


Abbildung 1-11: Schematische Darstellung einer hydrophilen Pore nach Stabilisierung des hydrophoben Randes der Doppelschicht mittels einkettiger Amphiphile unter Erniedrigung der Randwechselwirkungen g_p .

1.11 Darstellung und Eigenschaften von Phospholipidvesikeln

Vesikel können in sehr unterschiedlichen Größenordnungen dargestellt werden (vgl. Tabelle 1-1). Hierzu existieren eine ganze Reihe von Methoden, von denen im folgenden jedoch ausschließlich diejenigen Methoden vorgestellt werden, bei denen eine Kontaminierung der Vesikel durch organische Lösungsmittel oder grenzflächenaktive Substanzen auszuschließen ist. Problematisch zeigt sich die Darstellung von Vesikeln in enger Größenverteilung und einheitlicher Lamellenzahlen, was besonders im Bereich riesiger Vesikel schwer zu realisieren ist.

1.11.1 Kleine unilamellare Vesikel (SUV)

Kleine unilamellare Vesikel (SUV) können unter dem Einfluß von Kavitationskräften durch Ultraschallbehandlung erzeugt werden [27, 28]. Die Vesikel zeigen jedoch Anomalien in Eigenschaften und Stabilität [29] und weisen hohe Membranspannungen auf. Grund hierfür ist die ausgeprägte Membrankrümmung, die bedingt, daß sich die Phospholipide nicht mehr ihrer optimalen Packung entsprechend in der Doppelschicht einlagern können. Kleine unilamellare Vesikel sind intrinsisch asymmetrisch, sie weisen eine unterschiedliche Anzahl an Molekülen und unterschiedliche Krümmungen in der jeweiligen Monoschicht auf. Sie sind thermodynamisch instabiler als ihre großen Pendanten und gehen häufig Fusionen ein, um den Überschuß an freier Energie zu dissipieren.

1.11.2 Große unilamellare Vesikel (LUV)

Zur Darstellung großer unilamellarer Vesikel in homogener Größenverteilung eignet sich die Extrudermethode [30]. Hierbei wird eine Dispersion multilamellarer Vesikel mehrfach durch eine Polycarbonatmembran mit etwa 6 μm langen zylindrischen Poren gepreßt. Die Vesikel werden zylindrisch deformiert und zerfallen in unilamellare Vesikel [31]. Die Größe der Vesikel ist abhängig von dem verwendeten Porendurchmesser der Polycarbonatmembran, wobei die Homogenität der Größenverteilung durch mehrmaliges Gefrieren und Auftauen der eingesetzten multilamellaren Vesikel verbessert werden kann [32]. Der Vorteil der Methode liegt in der Einfachheit und dem vergleichbar geringen zeitlichen Aufwand.

1.11.3 Riesige Vesikel (GUV)

Die Darstellung riesiger Vesikel kann unter Verwendung der Quellmethode wie auch der Elektropräparation erfolgen. Die Membran riesiger Vesikel ist mit Hilfe der Videomikroskopie visualisierbar, so daß detaillierte Aussagen über strukturelle, wie auch intrinsische Änderungen der Doppelschicht möglich werden.

1.11.3.1 Quellmethode

Bei der Quellmethode nach Reeves und Dowben [33] wird zunächst ein dünner Film des Phospholipids durch Spreiten einer Lösung des Lipids in Chloroform auf ein Substrat (Glas oder Teflon) und anschließender Entfernung des Lösungsmittels erzeugt. Nach Zugabe von Wasser erfolgt die Quellung (vgl. Abbildung 1-12) unter Bildung riesiger unilamellarer und multilamellarer Vesikel. Nachteilig bei der Quellmethode ist die oftmals sehr geringe Ausbeute an unilamellaren Vesikeln.

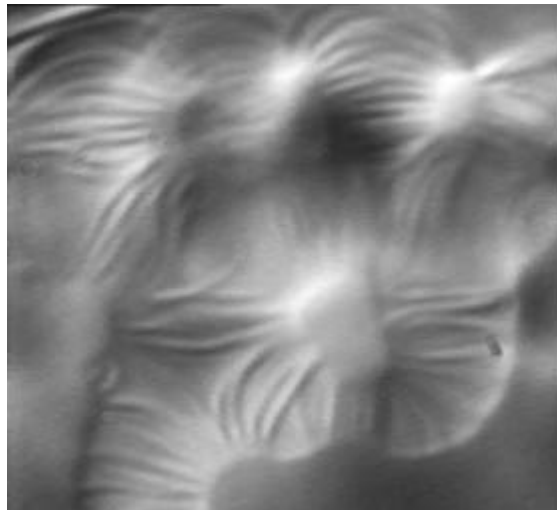


Abbildung 1-12: Mikroskopische Aufnahme der Lamellenbildung bei Beginn der Quellung von DMPC in Wasser.

1.11.3.2 Elektropräparation

Eine deutliche höhere Ausbeute an unilamellaren Vesikeln liefert die Methode der Elektropräparation in einem elektrischen Wechselstromfeld [34]. Hierbei wird ein dünner Film des Phospholipids auf einer von zwei gegenüberliegenden Elektroden erzeugt. Die Elektroden bestehen aus zwei plan-parallelen Glasplatten, die den eigentlichen Reaktionsraum bilden und auf der Innenseite mit einem elektrisch leitendem Indium-Zinnoxid beschichtet sind (ITO-Glas). Die Transparenz der Reaktionszelle erlaubt die mikroskopische Kontrolle des Präparationsverlaufs. Zur Vesikeldarstellung wird die Zelle mit Wasser gefüllt. Durch Anlegen eines Wechselfeldes von 10 Hz und einer sukzessiven Erhöhung der Feldstärke auf

$1 - 3 \text{ V} \cdot \text{cm}^{-1}$ erfolgt die Bildung unilamellarer Vesikel, deren Durchmesser sich mit der Zeit durch Fusionen erhöht. Die Vesikel weisen direkt nach der Präparation hohe Membranspannungen von $10^{-3} - 10^{-4} \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$ auf, relaxieren jedoch nach etwa einer Stunde auf Spannungen von etwa $10^{-8} \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$ [35].

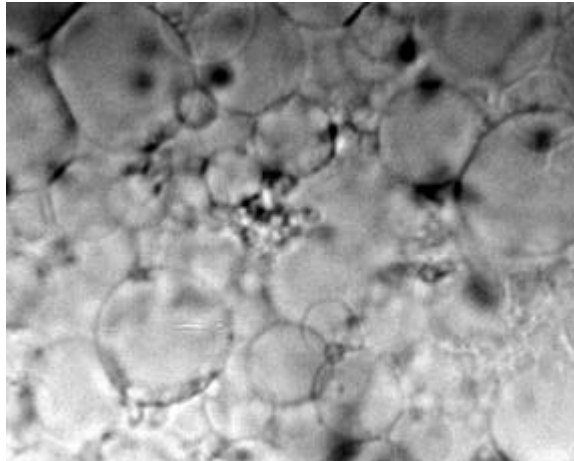


Abbildung 1-13: Videomikroskopische Aufnahme von auf der Elektrode adsorbierten Vesikeln während der Elektropräparation.

1.12 Solubilisierung in Mizellen und Vesikeln

Die Solubilisierung spielt in vielen technischen Prozessen wie dem Färben, der Stofftrennung und dem Reinigen eine bedeutende Rolle. Als Solubilisierung bezeichnet man im engeren Sinne die Herstellung einer thermodynamisch stabilen, isotropen Lösung einer mäßig- bis schwerlöslichen Substanz in einem umgebenden Lösungsmittel (zumeist Wasser) durch Zugabe amphiphiler Substanzen [36]. Die Lösungsvermittler können hierbei in Form von Monomeren mit der unpolaren Substanz interagieren oder nach Aggregation zu Assoziationskolloiden wie Mizellen oder Vesikeln[‡] das entsprechende lipophile Solubilisat in den lipophilen Bereich einlagern. Die solubilierte Substanz befindet sich in der Folge in einem dynamischen Gleichgewicht mit der wässrigen Umgebung.

Der Einbau eines lipophilen Solubilisats in den lipophilen Bereich führt zum Quellen des Assoziats und verläuft somit unter Aufwendung von Volumenarbeit pV . Der Druck p folgt in Mizellen aus dem Laplacedruck. Im Bereich der Kopfgruppen kommt es bedingt durch die veränderten Packungsbedingungen zu ungünstigen Wechselwirkungen, wodurch das Solubilisierungsvermögen begrenzt wird.

[‡] Bei der Solubilisierung in Vesikeln kann nach den angeführten Voraussetzungen nicht von isotropen, thermodynamisch stabilen Aggregaten ausgegangen werden, so daß die exakte Definition der Solubilisierung und entsprechend einer Solubilisierungskapazität schwierig ist.

Für mizellare Systeme gilt im Falle der Einlagerung eines Solubilisats mit dem Molvolumen V_m und der Konzentration c in der Mizelle [37]

$$c = c_{\infty} \cdot \exp\left(-\frac{2gV_m}{r_m RT}\right). \quad (1.8)$$

Hierbei bezeichnet r_m den Radius der Mizelle, g die Grenzflächenspannung zwischen Wasser und der Mizelle und c_{∞} die Sättigungskonzentration des Solubilisats in einer vergleichbaren makroskopischen Phase. Aus Gleichung (1.8) wird ersichtlich, daß Kugelmizellen ein kleineres Solubilisierungsvermögen für lipophile Substanzen aufweisen, als Scheibchenmizellen, lamellare Phasen oder Vesikel. Ferner hängt die Solubilisierungskapazität stark von der Temperatur, der Ionenstärke, sowie der Struktur und Polarität des Solubilisats ab.

1.13 Anwendungsbeispiele vesikulärer Systeme

Vesikel sind für eine Vielzahl bereits realisierter und potentieller Anwendungsgebiete von Interesse, von denen einige exemplarisch vorgestellt werden. Hierbei muß besonders auf einen Unterschied hingewiesen werden, den vesikuläre Strukturen gegenüber thermodynamisch stabilen Systemen wie Mizellen oder Mikroemulsionen aufweisen. Die Verwendung thermodynamisch stabiler Systeme hat den Nachteil, daß diese sehr schnell auf Änderung der chemischen Umgebung reagieren. Ein häufiges Problem ist das Auftreten von Verdünnungen während des Einsatzes. Hierbei kommt es bei Mizellen und Mikroemulsionen oftmals zur Destabilisierung der Strukturen und infolgedessen zu einer unerwünschten Wirkstofffreigabe oder zur Ineffizienz der erwünschten Wirkung. Phospholipidvesikel sind hingegen, wie bereits diskutiert, kinetisch festgesetzte Strukturen mit metastabilem Charakter und somit weitestgehend stabil gegen Verdünnung. Sie können als „Transportcontainer“ oder zur Solubilisierung lipophiler Substanzen auch in hoher Verdünnung eingesetzt werden.

1.13.1 Bedeutung von Vesikeln als wirkstoffliefernde Systeme

Vielfach ist der direkte Einsatz eines Wirkstoffes aufgrund seiner geringen Löslichkeit oder unzureichenden Spezifität nicht möglich, so daß für eine zielgerichtete Applikation zusätzlich ein wirkstofflieferndes System benötigt wird. Im Bereich biologischer Systeme sind hierzu Vesikel aufgrund ihrer Biokompatibilität besonders geeignet und führen zu einer deutlichen Erhöhung der Effizienz. So kann beispielsweise durch den Einsatz liposomaler Pflanzenschutzmittel die nötige Pestizidmenge um bis zu 50% reduziert werden, da hierdurch ein verbesserter Transport durch die pflanzliche Cuticula erfolgt [38].

Die zielgerichtete Verabreichung ist insbesondere in der Medizin von Bedeutung. Liposomen spielen im biologischen System eine entscheidende Rolle beim inter- wie auch intrazellulären Transport von Makromolekülen. Analog sollte es möglich sein, Wirkstoffe mit Hilfe von Vesikeln selektiv am gewünschten Zielort freizusetzen, um beispielsweise Krebs-

zellen zu bekämpfen. Die Applikation liposomengebundener Medikamente kann durch Injektion in die Blutbahn erfolgen. Diese Methode hat den Vorteil der langsamen und gezielten Freisetzung oftmals stark zell- und gewebeschädigender Wirkstoffe nach Eintrag in den Organismus. Hochflexible Vesikel, sogenannte TransfersomenTM, sind in der Lage, die Haut diffusiv zu durchdringen und solubilisierete Wirkstoffe in die Blutbahn einzubringen. Auf diese Weise soll es in Zukunft möglich sein, Medikamente wie Insulin durch Auftragen auf die Haut ohne eine nötige Injektion zu applizieren [10].

1.14 Verwendung von Vesikeln zur Solubilisierung lipophiler Substanzen

Im Bereich industrieller Anwendungen werden zunehmend Tenside wie die Phospholipide interessant, die als nachwachsender Rohstoff wenig kostenintensiv, gleichzeitig leicht biologisch abbaubar und somit umweltverträglich sind. Phospholipide fallen als Nebenprodukt der Sojaölproduktion kostengünstig an und dienen in Form von Vesikeln zur Solubilisierung lipophiler Substanzen. Neben einer möglichen Verwendung von Vesikeln zur tertiären Erdölförderung [12], zeigen diese sehr gute Eigenschaften bei der Sanierung ölkontaminierter Böden [13] und der Beseitigung von Öl auf Wasseroberflächen [14]. Die Grenzflächenspannung einer Hexadekan/Wasser-Grenzfläche wird beispielsweise bis auf Werte von $\gamma \approx 3 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$ erniedrigt [12]. Weiterhin ist die Stabilität der Vesikel gegen Verdünnung von erheblichen Vorteil. Mehrwertige Kationen wie Ca^{2+} , die insbesondere bei Anwendungen im Bereich des Bodens vorhanden sind, zeigen bei Abwesenheit anionischer Phospholipide keinerlei Einfluß auf die Vesikelstruktur [13].

1.15 Problemstellung

Phospholipide sind als natürliche Lösungsvermittler in Form von Vesikeln in der Lage lipophile Substanzen zu solubilisieren und somit deren Löslichkeit im wässrigen Milieu beträchtlich zu erhöhen. Dies eröffnet eine Vielzahl potentieller Anwendungsmöglichkeiten und spielt vermutlich eine wichtige Rolle bei natürlich auftretenden Mobilisierungserscheinungen lipophiler Schadstoffe im Bereich der Pedosphäre.

Während unilamellare Phospholipidvesikel gut charakterisierte Systeme darstellen, ist bezüglich der Interaktion mit lipophilen Substanzen recht wenig bekannt. Für eine Vielzahl von Anwendungen ist eine umfassende Kenntnis hinsichtlich des Einflusses lipophiler Solubilisate auf die Eigenschaften der Vesikelmembran sowie eine detaillierte Aufklärung der Mechanismen der Solubilisierung unerlässlich. Dies war Motivation der vorliegenden Arbeit, die sich detailliert dem Studium der Interaktion lipophiler aromatischer Substanzen mit der Doppelschicht von Phospholipidvesikeln widmet. Hierzu erfolgt zunächst eine Lokalisierung des Solubilisats und eine Charakterisierung des Einflusses auf die strukturellen sowie thermotropen Eigenschaften der Doppelschicht.

Ein Schwerpunkt der Untersuchungen liegt auf der Bestimmung der Biegesteifigkeit, einer wichtigen elastischen Eigenschaft der Vesikelmembran. Hierzu wird als Methode die Videomikroskopie vorgestellt, die im Rahmen dieser Arbeit etabliert und zur Bestimmung der Biegesteifigkeit quasi-sphärischer Vesikel verwendet wurde. Auf dieser Methode basierend wird erstmals der konzentrationsabhängige Einfluß von Toluol als lipophilem Solubilisat auf die Biegesteifigkeit unilamellarer DMPC-Vesikel aufgezeigt und mit den Ergebnissen auf molekularer Ebene korreliert.

Ferner wird der eigentliche Solubilisierungsprozeß lipophiler Substanzen durch Vesikel analysiert. Zur Ermittlung der Interaktion von Vesikeln mit natürlichen Zellen wird eine Studie vorgestellt, die sich der Untersuchung des Einflusses auf das mutagene Potential widmet.

Abschließend werden mögliche Anwendungen von Vesikeln, die auf der Wechselwirkung mit lipophilen Solubilisaten beruhen, aufgezeigt. Hierzu zählt die Nutzung der Vesikelgestalt als Templat zur Darstellung von Kapselmaterialien sowie die Darstellung morphologisch schaltbarer vesikulärer Systeme.

Ergebnisse

2 Lokalisierung lipophiler Solubilisate innerhalb der Doppelschicht von Phospholipidvesikeln

2.1 Untersuchungsmethoden zur Lokalisierung des Solubilisats in Vesikeln

Die Charakterisierung des Einflusses eines Solubilisats auf die physiko-chemischen Eigenschaften von Vesikeln erfordert die Kenntnis der Lokalisierung des Gast-Moleküls im Bereich der Doppelschicht des Assoziats. Der Aufenthaltsort kleiner aromatischer Solubilisate in Vesikeln wird wie bei mizellaren Systemen durchaus kontrovers diskutiert: Benzol wird sowohl im inneren Membranbereich [39], als auch im Kopfgruppenbereich [40] fluider Vesikel vermutet. Demgegenüber ist Pyren wahrscheinlich im rein lipophilen Bereich lokalisiert [41]. Hinsichtlich dieser Problematik wurden zunächst detaillierte Untersuchungen der Einlagerung aromatischer Solubilisate in unilamellaren Vesikeln mit Hilfe der Protonenresonanzspektroskopie, der Röntgenbeugung und der Fluoreszenzspektroskopie durchgeführt.

2.2 Protonenresonanzspektroskopie zur Charakterisierung der Packungseigenschaften innerhalb der Doppelschicht

Die Protonenresonanzspektroskopie ist eine empfindliche Methode zur Detektion von Packungsänderungen der Phospholipidmoleküle innerhalb der Doppelschicht von Vesikeln. Auf diese Weise kann das thermotrope Verhalten der Phospholipide untersucht [42] und eine Einlagerung von Solubilisaten in die Doppelschicht nachgewiesen werden [43]. Weiterhin besteht die Möglichkeit lipophile aromatische Solubilisate in Mizellen [29] sowie innerhalb der Doppelschicht kleiner unilamellarer Vesikel [44,41] zu lokalisieren und zu quantifizieren.

Die intrinsischen Eigenschaften kleiner unilamellarer Vesikel werden durch die unterschiedlichen Krümmungen beider Monoschichten stark beeinflusst, ein Effekt, der ebenfalls spektroskopisch detektierbar ist. Die beiden Schichten weisen, bedingt durch die Präparationsart, eine unterschiedliche Anzahl an Lipidmolekülen sowie verschiedene Packungsdichten auf. Der lipophile Bereich der äußeren Monoschicht ist hierbei im Vergleich zur inneren dichter gepackt (vgl. Abbildung 2-1).

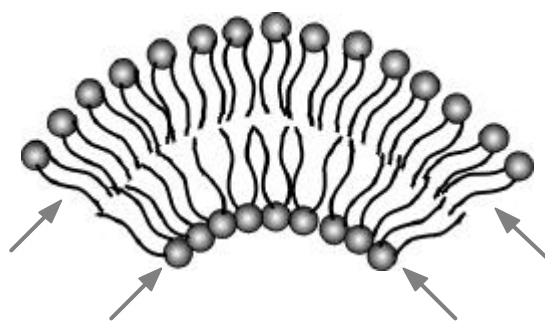
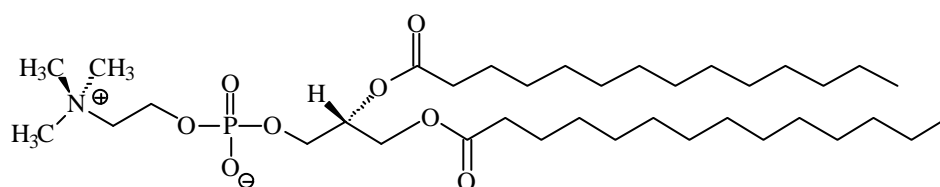


Abbildung 2-1: Ausschnitt aus der Doppelschicht eines kleinen unilamellaren Vesikels mit hoher Membrankrümmung. Der Überschuß der Amphiphilmoleküle in der äußeren Monoschicht bedingt Unterschiede in den Packungsdichten. Die Pfeile markieren die jeweils dicht gepackten Bereiche. Hierzu zählen der lipophile Bereich der äußeren Monoschicht und der Kopfgruppenbereich der inneren Monoschicht. Der lipophile Bereich der inneren Monoschicht, sowie der Kopfgruppenbereich der äußeren Monoschicht sind hingegen vergleichsweise locker gepackt.

Die dichte Packung des lipophilen Bereichs der äußeren Monoschicht führt ferner zu verstärkten Wechselwirkungen der Aylreste unter Expansion der Elektronenwolken der Protonen. Diese erfahren somit eine Entschirmung und zeigen im ^1H -NMR-Spektrum eine Resonanz bei geringfügig tieferem Feld im Vergleich zu Acyl-Protonen der inneren Monoschicht [42]. Die eingeschränkte Beweglichkeit der unpolaren Ketten der äußeren Monoschicht ist vermutlich Grund für die vergrößerte Linienbreite der terminalen Methyl- und der Methylenresonanzen dieser Schicht. Hierdurch kommt es zu einer Überlagerung der Signale, so daß ein Unterschied der Resonanzen oftmals nicht auflösbar ist. Abbildung 2-2 zeigt das ^1H -NMR-Spektrum von DMPC-Vesikel in D_2O nach Ultraschallbehandlung mit der Zuordnung der entsprechenden Resonanzen [44]. Die unterschiedlichen Resonanzen der Methylgruppen des Cholin bei einer chemischen Verschiebung δ von 3.32 ppm und 3.28 ppm der äußeren und inneren Monoschicht sind in Abbildung 2-2 gut detektierbar. Grund für die Differenzierung sind vermutlich elektrostatische Effekte [45]. Der dichter gepackte Kopfgruppenbereich der inneren Doppelschicht liefert erwartungsgemäß eine Resonanz bei höherem Feld [46].



Dimyristoylphosphatidylcholin (DMPC)

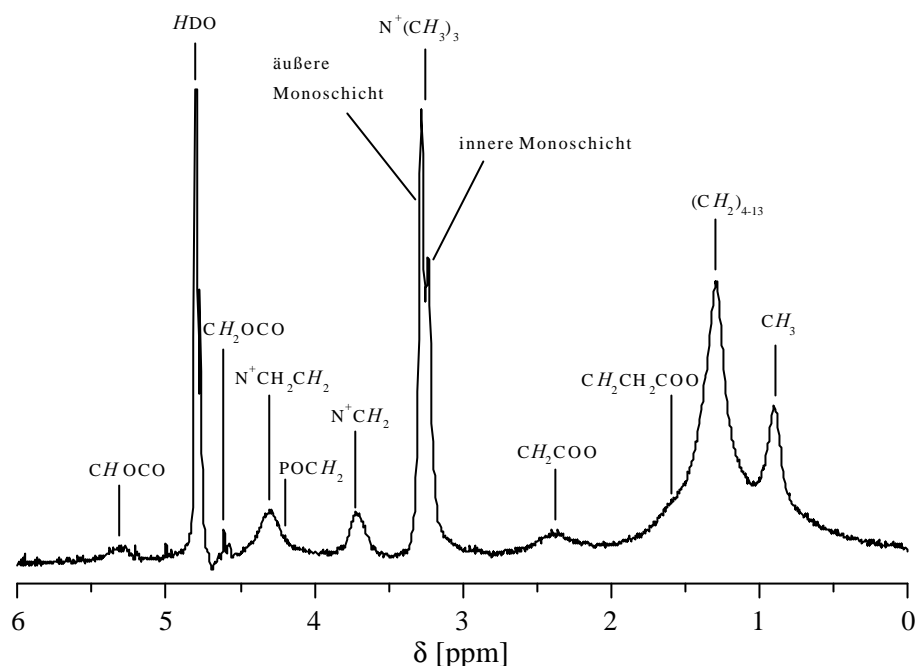


Abbildung 2-2: Strukturformel von DMPC und 200 MHz-Protonenresonanzspektrum kleiner unilamellarer DMPC-Vesikel ($c = 10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) in D_2O bei 25°C (L_α -Phase). Die Signale sind mit der jeweiligen Zuordnung versehen [44]. Die Resonanzen bei 3.32 ppm und 3.28 ppm im Verhältnis 2:1 entsprechen den Methylgruppen des Cholin der äußeren und der inneren Monoschicht. Grund hierfür ist der zweifache Überschuß an Amphiphilmolekülen in der äußeren Monoschicht im Vergleich zur inneren und die resultierenden Unterschiede in den Packungsdichten gemäß Abbildung 2-1.

2.2.1 Interaktion lipophiler Solubilisate mit der Doppelschicht von Vesikeln

Die Einlagerung einer lipophilen Substanz in die Doppelschicht von Vesikeln beeinflusst die Packungsdichte und führt zu einer detektierbaren Änderung der chemischen Umgebung der Protonen des Amphiphils. Durch sukzessive Erhöhung der Solubilisatkonzentration sollte es möglich sein, bei konstanter Temperatur Informationen über die Lokalisierung des Solubilisats innerhalb des Membranbereichs als Funktion der Konzentration zu erhalten. Aromatische Solubilisate fungieren innerhalb der Doppelschicht zusätzlich als eine Art „Sonde“, da sie eine selektive Änderung der chemischen Verschiebung der Protonen benachbarter Phospholipidmoleküle verursachen [41,47]. Grund hierfür ist die diamagnetische Anisotropie des aromatischen Systems. Bei Wechselwirkung des Aromaten mit Protonen des Amphiphils erfahren diese effektiv eine scheinbare Abschirmung. Hieraus folgt eine Resonanz der Protonen bei höherem Feld [29].

Die ^1H -NMR-spektroskopischen Untersuchungen erfolgten durch Titration einer homogenen Dispersion kleiner unilamellarer Vesikel mit einer Reihe aromatischer Solubilisate.

Abbildung 2-3 zeigt typische Protonenresonanzspektren nach Solubilisierung von Toluol in DMPC-Vesikeln.

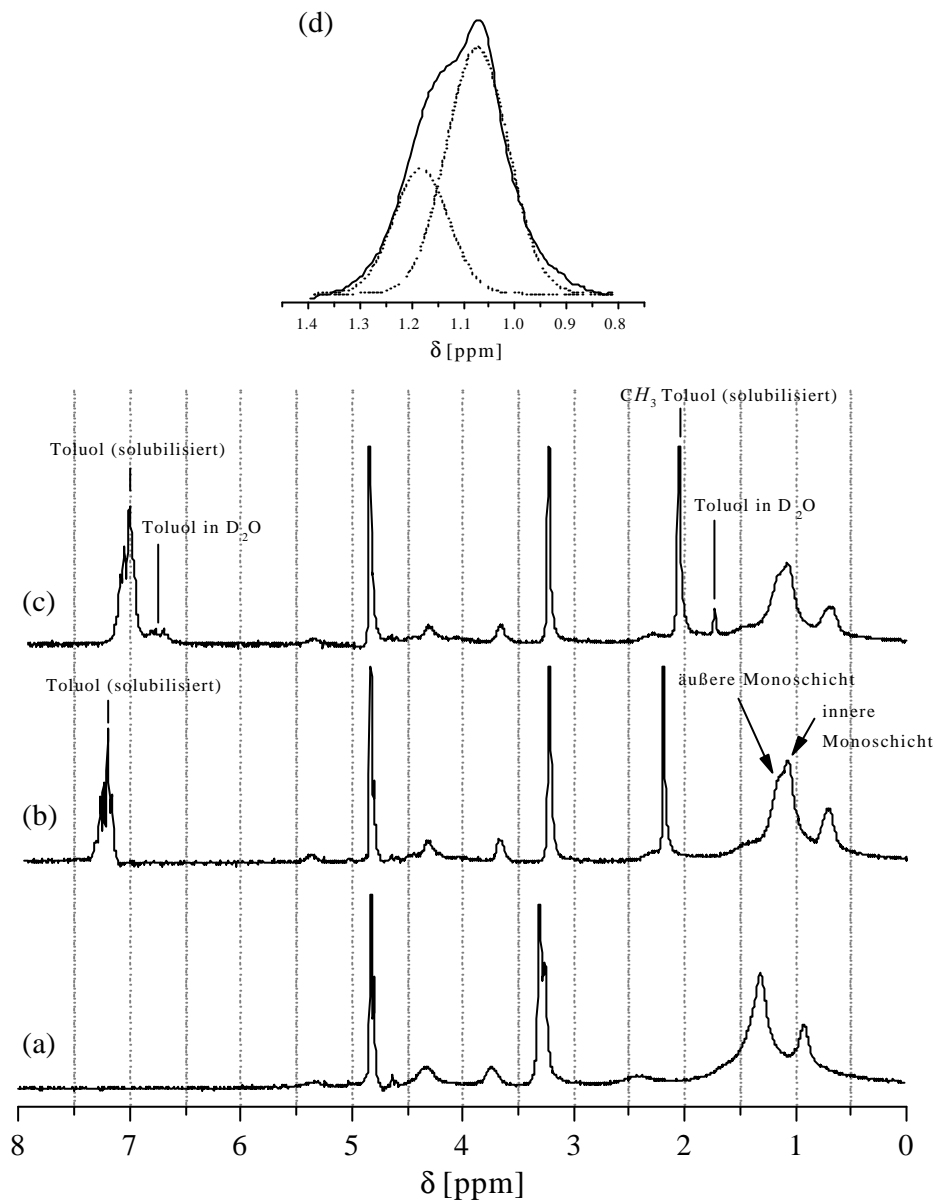


Abbildung 2-3: 200 MHz- ^1H -NMR-Spektrum kleiner unilamellarer DMPC-Vesikel in D_2O in Abwesenheit von Toluol (a) und mit solubilisiertem Toluol (0.4 mg/mg DMPC) im Bereich der Doppelschicht (b). Die Zugabe von Toluol (0.9 mg/mg DMPC) oberhalb der Solubilisierungskapazität der Vesikel (c) führt zu zusätzlichen Resonanzen von Toluol in der Wasserphase. Mit zunehmender Toluolkonzentration wird die Differenzierung der Methylenresonanzen in eine breite Komponente bei tiefem und eine schmale bei hohem Feld deutlich (d). (d) zeigt die Methylenresonanzen aus (b). Die Methylsignale des Cholin im Kopfgruppenbereich bei $\delta \approx 3.3$ ppm sind mit steigender Toluolkonzentrationen nicht mehr unterscheidbar.

Die Wechselwirkung des Solubilisats mit dem Amphiphil innerhalb der Vesikel wird durch eine charakteristische Hochfeldverschiebung der Acylprotonen des Phospholipids und der Methylgruppen des Cholin manifestiert. Ferner ist solubilisiertes Toluol in Abbildung 2-3 (b) mit einer Resonanz bei $\delta = 6.9 - 7.3$ ppm ($CH_{\text{aromat.}}$) und $\delta = 2.0 - 2.3$ ppm (CH_3) detektierbar und läßt sich von emulgiertem Toluol $\delta = 6.7$ ppm ($CH_{\text{aromat.}}$) und $\delta = 1.8$ ppm (CH_3) bei Konzentrationen oberhalb des Solubilisierungsvermögens der Vesikel unterscheiden. Das Solubilisat zeigt somit ebenfalls eine konzentrationsabhängige Hochfeldverschiebung. Dies deutet auf intermolekulare Toluolwechselwirkungen innerhalb der Doppelschicht in Form von π -Stapeln hin [48]. Der konzentrationsabhängige Verlauf der Hochfeldverschiebungen ist für unterschiedliche Molekülbereiche in Abbildung 2-4 wiedergegeben.

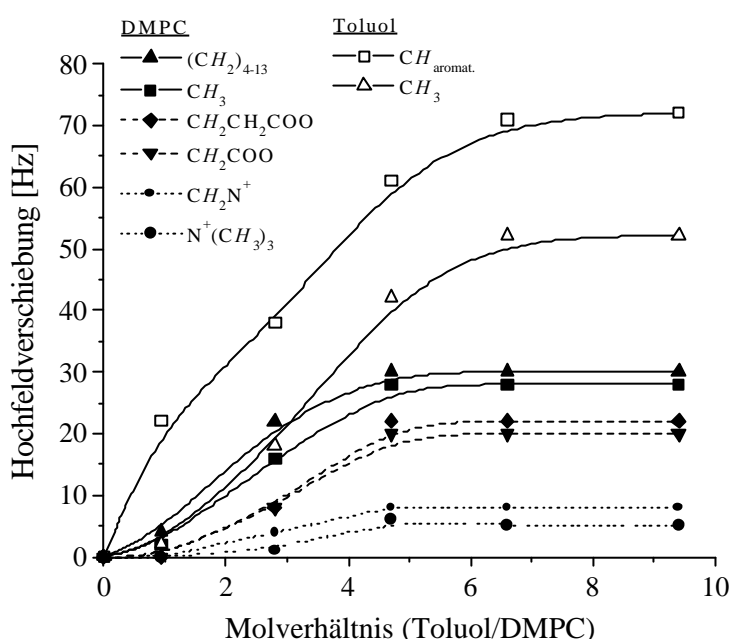


Abbildung 2-4: Mittlere Hochfeldverschiebung der aus dem 200 MHz-Protonenresonanzspektrum ermittelten Signale kleiner unilamellarer DMPC-Vesikel in Abhängigkeit von der zugeführten Toluolmenge. Vergleich der Verschiebung der Signale des solubilisierten Toluol (offene Symbole) mit denen des DMPC (gefüllte Symbole).

Auffällig ist die deutliche Hochfeldverschiebung der Protonen des DMPC unterhalb eines Molverhältnisses von etwa 4,5, gefolgt von einem Plateaubereich. Innerhalb dieses Plateaubereichs sollte die Interaktion von Lipid und Toluol maximal und die Lipid-Lipid-Wechselwirkungen durch Interkalation des Solubilisats nahezu vollständig aufgehoben sein. Ferner ist das Plateau der Hochfeldverschiebung der Resonanzen des Toluol geringfügig zu höheren Solubilisatkonzentrationen verschoben, so daß eine Aggregation von Toluol in der

Membran angenommen werden kann. Entsprechend werden die Resonanzen des solubilierten Toluol denen einer O/W-Emulsion ähnlicher.

Weiterhin verdeutlicht Abbildung 2-4 den Einfluß des aromatischen Solubilisats auf die unterschiedlichen Bereiche der Doppelschicht (gefüllte Symbole). Betrachtet man den jeweiligen Betrag der Hochfeldverschiebung, so fällt auf, daß dieser im lipophilen Bereich (durchgezogene Linie) maximal ist und in Richtung des Kopfgruppenbereichs (gepunktete Linie) deutlich abnimmt. Entsprechend wird mit steigender Solubilisatkonzentration wird die Einlagerung im Bereich der Kopfgruppe wahrscheinlicher.

2.2.1.1 Einfluß des Phasenverhaltens der Phospholipide

Der Vergleich des Einflusses des Solubilisats auf DMPC-Vesikel im fluiden Zustand (Abbildung 2-4) und DPPC-Vesikeln im Gelzustand in Abbildung 2-5 zeigt einen nahezu analogen Verlauf.

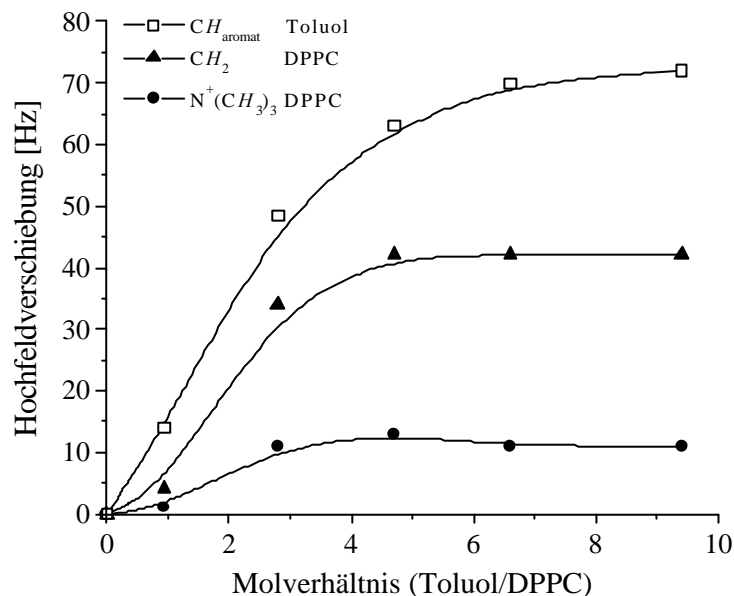


Abbildung 2-5: Durch Solubilisierung von Toluol bedingte Hochfeldverschiebung der Protonenresonanz kleiner unilamellarer DPPC-Vesikel in D_2O . Die Messung der Kernresonanzspektren erfolgte bei $25^\circ C$ in der Gelphase des DPPC bei einer Meßfrequenz von 200 MHz. Die starke Signalverbreiterung der Acylreste aufgrund der stark eingeschränkten Bewegungsfreiheit erschwert hierbei die exakte Detektion der Signale bei kleiner Solubilisatkonzentration.

Der Betrag der Hochfeldverschiebung der DPPC-Protonen ist geringfügig höher als bei DMPC im fluiden Zustand, ein Effekt, der auf die höhere Ordnung der Gelphase zurückzuführen ist. Das Plateau tritt bei einem etwas niedrigeren Molverhältnis auf. Dies deutet auf ein kleineres Solubilisierungsvermögen von Vesikeln im Gelzustand im Vergleich zu flui-

den Vesikeln hin [47]. Das Plateau der Hochfeldverschiebung der Resonanzen des Toluol hingegen zeigt in beiden Fällen identische Werte von etwa 70 Hz.

2.2.1.2 Einfluß der Gestalt des Solubilisats

Die Untersuchung der Solubilisierung von Styrol in DMPC-Vesikeln in der L_a -Phase ist in Abbildung 2-6 dargestellt. Hier zeigt sich für die beobachteten Hochfeldverschiebungen der Methylenresonanzen ein analoger Verlauf im Vergleich zur Einlagerung von Toluol (vgl. Abbildung 2-4), wobei im Bereich maximaler Solubilisatmenge keinerlei Abhängigkeit vom jeweiligen aromatischen Solubilisat festgestellt werden kann. Auffällig ist einzig die geringere Hochfeldverschiebung der Resonanzen des Styrol gegenüber Toluol. Dieser Effekt könnte ein Hinweis auf unterschiedliche Packungsdichten des Solubilisats im lipophilen Membranbereich sein.

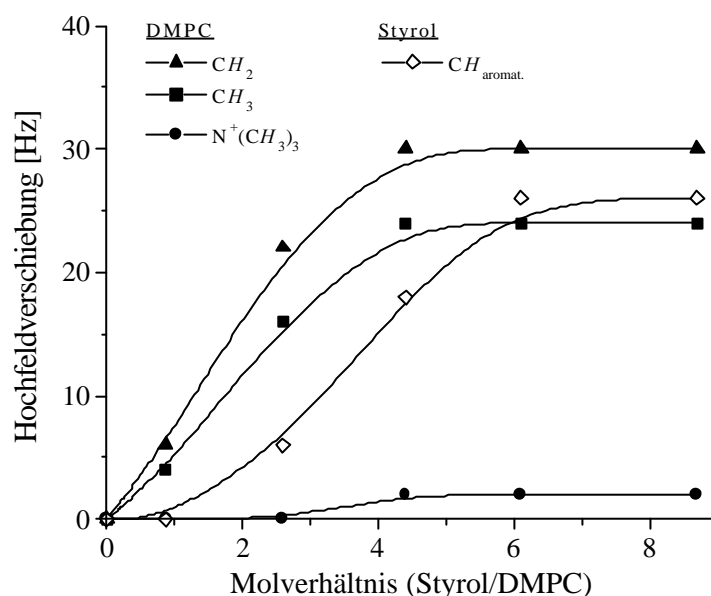


Abbildung 2-6: Hochfeldverschiebung der Protonenresonanzen nach Titration kleiner unilamellarer DMPC-Vesikel in D_2O mit Styrol bei einer Meßfrequenz von 200 MHz und einer Temperatur von 25°C.

2.2.1.3 Solubilisierungsvermögen der inneren und äußeren Monoschicht

Wie bereits beschrieben, sind die Packungsdichten der unterschiedlichen Bereiche der Monoschichten kleiner Vesikel keinesfalls identisch. Die hohe Krümmung der Vesikel bedingt die dichtere Packung des lipophilen Bereichs der äußeren Monoschicht im Vergleich zu inneren (vgl. Abbildung 2-1). Aus diesem Grunde sollte das Solubilisierungsvermögen für lipophile Substanzen ebenfalls Unterschiede in Bezug auf die Einlagerung in den einzelnen Monoschichten aufweisen. Hierzu wurden aromatische Solubilisate mit unterschiedlicher Affinität zum Kopfgruppenbereich des Amphiphils untersucht.

2.2.2 Einfluß des Solubilisats auf den Kopfgruppenbereich

Die beobachteten Hochfeldverschiebungen der Protonen des lipophilen Bereichs des DMPC zeigen keinerlei Abhängigkeit vom jeweiligen aromatischen Solubilisat im Bereich maximaler Solubilisatmenge. Die Verschiebung der Methylenprotonen des DMPC liegt bei Solubilisierung von Benzol, Toluol bzw. Styrol jeweils bei etwa 30 Hz.

Im Gegensatz zu den Beobachtungen des Einflusses auf den lipophilen Bereich der Vesikel, zeigt die mittlere Verschiebung der Methylresonanzen der Kopfgruppe in Abbildung 2-8 eine deutliche Abhängigkeit vom Solubilisat. Mit steigender Wasserlöslichkeit der Solubilisate wird eine deutliche Affinität zur Kopfgruppe des Amphiphils beobachtet. Diese ist bei Benzol bereits bei vergleichbar kleinen Molverhältnissen gegeben, während die vergleichbar schlechter löslichen Aromaten Toluol und Styrol erst bei einem molaren Überschuß in diesen Bereich verdrängt werden.

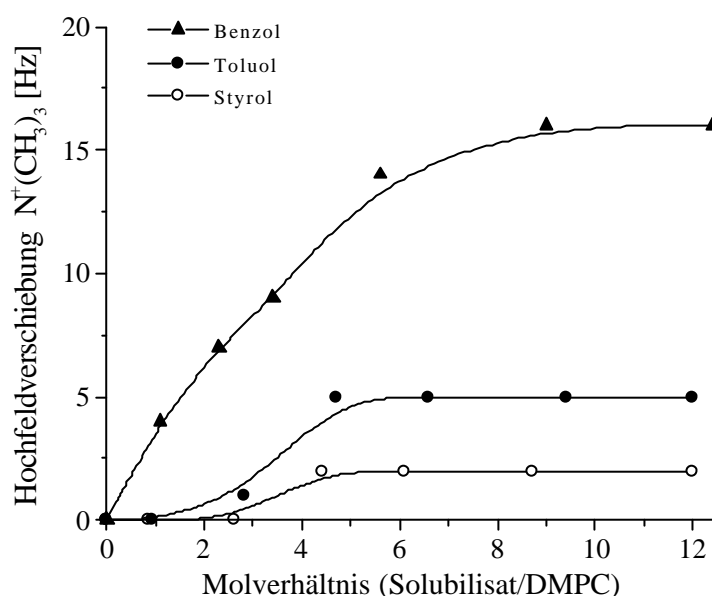


Abbildung 2-8: Mittlere Hochfeldverschiebung der Methylresonanz des Cholin im Kopfgruppenbereich kleiner unilamellarer DMPC-Vesikel unter dem Einfluß verschiedener aromatischer Solubilisate. Die Daten repräsentieren den Mittelwert der Verschiebung der Protonen der inneren und der äußeren Monoschicht.

Zum Vergleich liefert die Solubilisierung von Hexan in DMPC-Vesikeln eine kaum detektierbare Tieffeldverschiebung von 2 Hz. Diese wird einzig durch die lockere Packung der Phospholipidmoleküle und die hieraus bedingte geringere Lipid-Lipid-Wechselwirkung durch Interkalation von Hexan im Zwischenlipidbereich verursacht.

Die Differenzierung der Methylresonanz des Cholin im Kopfgruppenbereich für die einzelnen Monoschichten in Abbildung 2-9 verdeutlicht den Unterschied von Toluol und Styrol zu Benzol als Solubilisat (vgl. Abbildung 2-7).

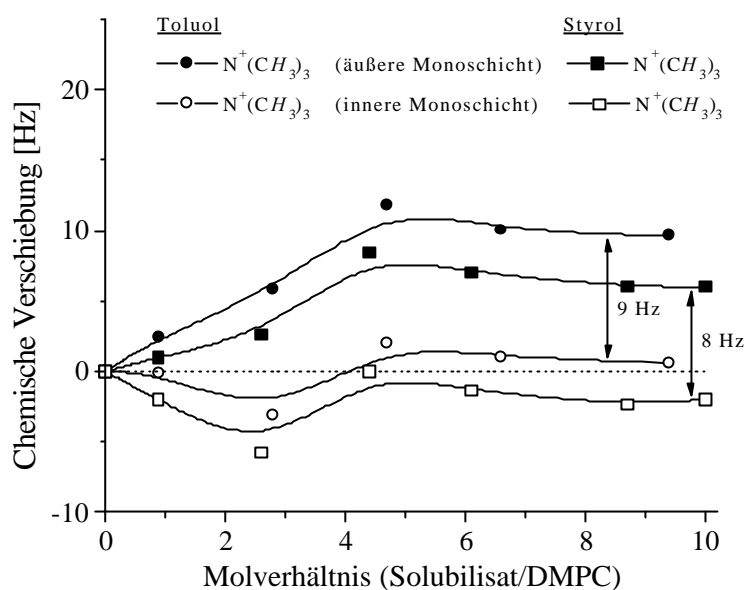


Abbildung 2-9: Verschiebung der Methylresonanz des Cholin bezogen auf die innere Monoschicht (offene Symbole) und die äußere Monoschicht (geschlossene Symbole). Positive Werte bezeichnen eine Verschiebung zu hohem, negative Werte zu tiefem Feld im Vergleich zu solubilisatfreien Vesikeln.

Der Kopfgruppenbereich der inneren, dichteren Monoschicht wird bei Solubilisierung von Toluol nur schwach und von Styrol scheinbar gar nicht beeinflusst. Die bei kleinen Styrolkonzentrationen beobachtbare Tieffeldverschiebung entspricht hierbei derjenigen der Einlagerung von Hexan in die Doppelschicht. Sie wird somit vermutlich durch die Zunahme der lateralen Abstände des Lipids verursacht [42]. Erst ab Molverhältnissen von etwa 3 wird eine Beeinflussung deutlich, so daß eine Angleichung der Packungsdichten der beiden Monoschichten zu erwarten ist [43]. Entsprechend zeigt sich eine nahezu identische Resonanz der Methylgruppen des Cholin der inneren und äußeren Monoschicht bei maximaler Solubilisatmenge (vgl. Abbildung 2-3).

Das ^1H -NMR-Spektrum von Vesikeln nach Solubilisierung aromatischer Substanzen mit ausgeprägter Affinität zur polaren Kopfgruppe des Amphiphils unterscheidet sich deutlich von Spektren nach Einlagerung lipophiler Substanzen. So verursacht die Einlagerung von Phenol eine Hochfeldverschiebung der Signale der Protonen im Kopfgruppenbereich, wobei die Protonen des unpolaren Bereichs um etwa 8 Hz tieffeldverschobene Resonanzen aufweisen (vgl. Daten im Anhang). Einflüsse dieser Art konnten für die beschriebenen unpolaren Moleküle nicht beobachtet werden. Dies verdeutlicht die Anordnung des Phenols als Cotensid im Bereich der Kopfgruppe des Amphiphils. Die Hydroxylgruppe weist vermutlich Kontakt mit der Wasserphase auf, während das aromatische System in den inneren Membranbereich der Doppelschicht ragt, ohne tief in diesen einzudringen. Mit steigender Solubilisatkonzentration kann es zur Bildung sogenannter verzahnter (L_{al}) Phasen kommen

[49,50]. Die Kettenenden der beiden Monoschichten gleiten unter Abnahme der Membrandicke ineinander. Die zunehmende Kompaktheit des lipophilen Bereichs ist somit der Grund für die beobachtete Protonenresonanz bei tieferem Feld.

2.2.3 Solubilisierungskapazitäten kleiner Vesikel

Aus den jeweiligen Verhältnissen der Intensitäten der Protonenresonanzen von Phospholipid und Solubilisat läßt sich im Bereich vollständiger Solubilisierung das maximale Solubilisierungsvermögen der Vesikel abschätzen. Ein entsprechender Vergleich ist in Tabelle 2-1 aufgeführt. Hierbei ist zu beachten, daß die ermittelten Werte nur als grobe Näherung angesehen werden können, da Gestaltänderung sowie Aggregationen und Fusionen der Vesikel während der Titrationsexperimente zu einer Verfälschung der Ergebnisse führen [29]. Besonders im Bereich hoher Solubilisatmengen werden die DMPC-Vesikel auch oberhalb T_m sehr instabil und neigen leicht zur Bildung größerer Aggregate. Diese zeigen geringere Intensitäten im Vergleich zu kleinen Vesikeln [51].

Tabelle 2-1: Solubilisierungskapazitäten von Phospholipiden in Form kleiner unilamellarer Vesikel ermittelt mit Hilfe von ^1H -NMR-spektroskopischen Titrationsexperimenten.

Phospholipid	Solubilisat	Solubilisierungskapazität Solubilisat/Phospholipid [mol/mol]
DMPC (L_a)	Styrol	2.9 ± 0.3
DPPC (L_β)	Toluol	3.2 ± 0.3
DMPC (L_a)	Toluol	4.5 ± 0.6
DMPC (L_a)	Benzol	5.6 ± 0.8

Der Vergleich zeigt, daß mit abnehmender Molekülgröße des Solubilisats die Solubilisierungskapazität steigt. Desweiteren zeigen Phospholipide in der fluiden Phase trotz vergleichbar kleinerem lipophilen Membranbereich eine höhere Solubilisierungskapazität [47].

2.2.4 Zusammenfassung

Mit Hilfe der ^1H -NMR-Spektroskopie ist es möglich, Aussagen über den Aufenthaltsort eines Solubilisats innerhalb der Doppelschicht kleiner Phospholipidvesikel vorzunehmen. Hierbei kann qualitativ zwischen den jeweiligen Monoschichten unterschieden werden.

Hinsichtlich des Aufenthaltsortes konnte gezeigt werden, daß polare Solubilisate wie Phenol ausschließlich im Kopfgruppenbereich verankert sind. Lipophile Solubilisate wie Benzol hingegen dringen in den unpolaren Bereich der Doppelschicht ein, zeigen jedoch noch eine deutliche Affinität zum Bereich der Kopfgruppe auf, die mit steigender Solubilisatmenge größer wird. Mit zunehmendem lipophilen Charakter und abnehmender Wasser-

löslichkeit des Solubilisats sinkt diese Affinität und ist im Falle des Toluol und insbesondere des Styrol bei kleiner Konzentration gering. Erst bei einem molaren Überschuß des Solubilisats gelangt dieses in den Kopfgruppenbereich. Dies zeigt, daß ein lipophiles Solubilisat innerhalb der Doppelschicht keineswegs fest verankert vorliegt. Vielmehr liegt es in dieser Matrix dispergiert vor und zeigt hinsichtlich der transversalen Anordnung eine definierte Verteilung. Der Charakter dieser Verteilung ist neben den physiko-chemischen Eigenschaften der Komponenten ebenfalls stark geprägt durch die vorherrschenden Packungsverhältnisse innerhalb der Doppelschicht.

Die detaillierte Untersuchung der Solubilisierung zeigt weiterhin, daß die Einlagerung lipophiler Substanzen selektiv in die Bereiche niedriger Packungsdichte erfolgt. Aus diesem Grund werden die Solubilisate bevorzugt in die innere lipophile Monoschicht kleiner unilamellarer Vesikel eingelagert.

Das Solubilisierungsvermögen von Phospholipidvesikeln ist von der Struktur und Größe des Solubilisats abhängig. Kleine kompakte Moleküle werden in großer Menge solubiliert. Insbesondere Vesikel im fluiden Zustand weisen ein höheres Solubilisierungsvermögen als im Gelzustand auf.

2.3 Röntgendiffraktometrie zur Charakterisierung struktureller Einflüsse innerhalb der Doppelschicht

Mit Hilfe der Röntgenbeugung ist es möglich, Informationen über die Art der Anordnung der Phospholipide innerhalb der Doppelschicht lamellarer Phasen zu gewinnen und den Einfluß lipophiler Solubilisate zu studieren [52]. Röntgenstrahlen wechselwirken mit Bereichen höher Elektronendichte innerhalb der Struktur, wobei diese Zentren selbst nach kohärenter Streuung wiederum als (sekundäre) Strahlungsquelle fungieren. Die Amplitude der gestreuten Strahlung ist der lokalen Elektronendichte direkt proportional. Die interferierenden Wellen, die an verschiedenen Regionen gestreut werden, erzeugen nach Detektion ein Röntgendiffraktogramm. Konstruktive Interferenz tritt immer dann auf, wenn die Bragg'sche Reflexionsbedingung

$$2d \cdot \sin \mathbf{q} = n\mathbf{l} \quad (n = 1, 2, 3, \dots) \quad (2.1)$$

erfüllt ist. \mathbf{l} kennzeichnet die Wellenlänge der Röntgenstrahlung und d den Netzebenenabstand. Aus dieser Beziehung folgt eine reziproke Abhängigkeit der Entfernung der Strukturdetails vom Bragg-Winkel \mathbf{q} .

Die Diffraktogramme von Mesophasen unterscheiden sich aufgrund ihres amorphen Charakters deutlich von denen kristalliner Strukturen. Sie weisen keinerlei scharfe Peaks auf, sondern zeigen diffuse Banden analog den Pulverdiffraktogrammen. Zur Charakterisierung der Strukturmerkmale wird zwischen den Reflexen im Kleinwinkelbereich ($\mathbf{q} \leq 5^\circ$) und denen im Weitwinkelbereich ($\mathbf{q} > 9^\circ$) unterschieden. Die Reflexe definierter Verhältnisse im Kleinwinkelbereich liefern Informationen über die Überstruktur des Amphiphils und kön-

nen zur Abschätzung der vertikalen Dimensionen der Doppelschichten lamellarer Phasen herangezogen werden [53]. Die Weitwinkelreflexe ermöglichen Aussagen über die Packung und das Molekülgitter der unpolaren Ketten im lipophilen Bereich der Doppelschicht. Diese Anordnung ist abhängig vom Zustand der Acylreste des Phospholipids. Rigid e Ketten der Lecithine im Gelzustand weisen eine senkrechte Anordnung zur Membranebene auf und liefern scharfe Reflexe bei $d = 0.42$ nm, während Diffraktogramme fluider Ketten diffuse Banden bei etwa $d = 0.46$ nm zeigen [52].

2.3.1 Einfluß des Solubilisats auf die Membrangeometrie

Zur Untersuchung des Einflusses eines im lipophilen Bereich der Doppelschicht eingelagerten Solubilisats auf die Membrangeometrie wurden wäßrige Dispersionen vollständig hydratisierter lamellarer Phasen von DMPC in der L_a -Phase analysiert. Die solubilisierte Toluolmenge wurde hierzu bei konstantem DMPC/Wasser-Verhältnis variiert. Die vollständige Hydratisierung ist für die vergleichenden Untersuchungen relevant, da der Ordnungszustand der Lipide, die in lamellaren Phasen auftreten, neben einer Temperaturabhängigkeit auch eine Abhängigkeit vom Hydratisierungsgrad aufweist [54]. Ein typisches Diffraktogramm von DMPC ist in Abbildung 2-10 dargestellt.

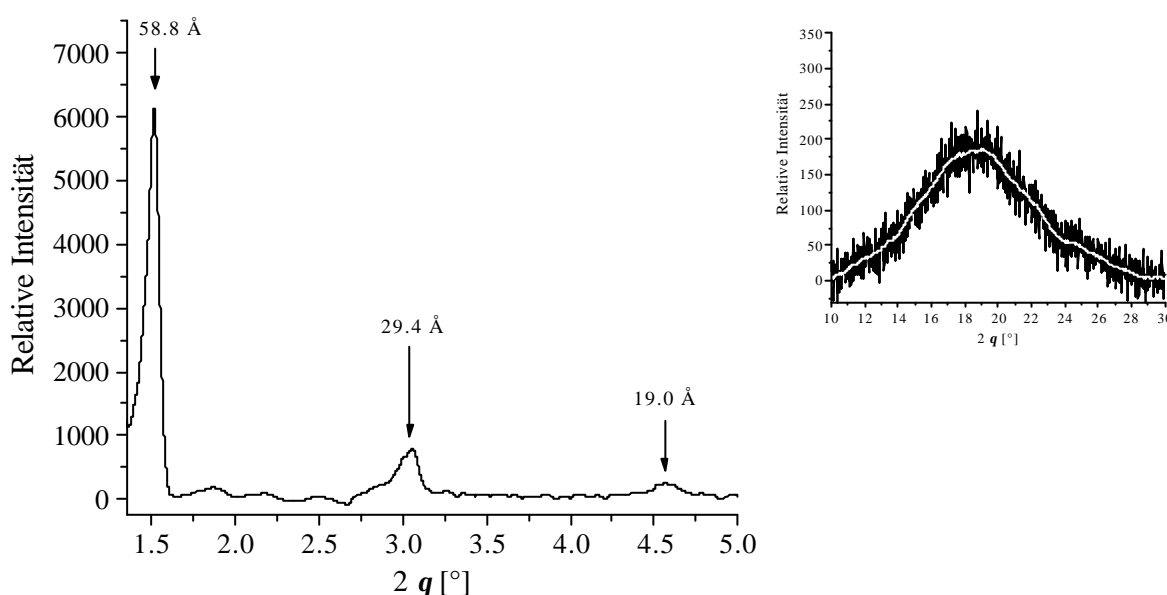


Abbildung 2-10: Röntgendiffraktogramm vollständig hydratisierter lamellarer Phasen von DMPC (mit 40 Gew.-% Wasser) in der L_a -Phase nach Einlagerung von Toluol im lipophilen Membranbereich ($T = 25^\circ\text{C}$). Markiert sind die Peaks der Reflexe $n = 1 - 3$ des Kleinwinkelbereichs mit Angabe der Netzebenenabstände d . Die eingefügte Grafik zeigt die diffuse Bande der fluider Ketten im Weitwinkelbereich.

Die Reflexe im Kleinwinkelbereich des Diffraktogramms lamellarer Phasen von DMPC entsprechen den jeweiligen Lamellenordnungen $n = 1, 2, 3$ der Reflexe und sind entsprechend den relativen Intensitäten I_{rel} in Tabelle 2-2 aufgeführt.

Tabelle 2-2: Ergebnisse der Röntgenbeugungsuntersuchung vollständig hydratisierter lamellarer DMPC-Phasen (mit 40 Gew.-% Wasser) in Abhängigkeit vom Molverhältnis Toluol/DMPC bei einer Temperatur von $T = (25 \pm 1)^\circ\text{C}$.

Reflexe	Molverhältnis [Toluol/DMPC]					
	0		4		11	
Kleinwinkel	d [Å]	I_{rel}	d [Å]	I_{rel}	d [Å]	I_{rel}
$n = 1$	58.8	6700	58.8	4500	57.0	3800
$n = 2$	29.4	1600	29.4	850	28.7	560
$n = 3$	19.0	160	19.8	150	18.8	140
Weitwinkel	4.5	100	4.7	90	4.8	80

Hierbei entspricht der Reflex der Ordnung $n = 1$ der Zwischenschichtperiodizität d_0 der Doppelschichten (vgl. Abbildung 2-11). Die Membrandicke d_1 kann somit bei bekannter Dichte r_s der Dispersion in guter Näherung aus der Zwischenschichtperiodizität d_0 abgeschätzt werden [53]. Es gilt

$$d_1 = d_0 - d_w . \quad (2.2)$$

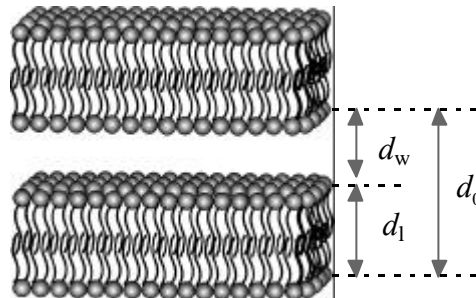


Abbildung 2-11: Schematische Darstellung der Doppelschichtstruktur hydratisierter lamellarer Phasen zur Erläuterung der Ermittlung der Dicke d_1 der Doppelschicht.

Die effektive Dicke der Wasserschicht d_w mit der Dichte r_w ist gegeben durch

$$d_w = d_0 \cdot \frac{m_w}{m_s} \cdot \frac{r_s}{r_w} . \quad (2.3)$$

Die ermittelten Schichtdicken sind für die lamellaren DMPC-Phasen im solubilisatfreien Zustand sowie für den Bereich maximaler Toluolkonzentration in Tabelle 2-3 zusammengefaßt.

Tabelle 2-3: Vergleich der ermittelten Schichtdicken lamellarer DMPC-Phasen bei einer Temperatur von $T = (25 \pm 1)^\circ\text{C}$ in Abhängigkeit von der Toluolkonzentration.

Toluol/DMPC	r_s [g·mL ⁻¹]	d_0 [nm]	d_w [nm]	d_l [nm]
0	1.025	5.89	2.41	3.48
11	0.945	5.73	1.14	4.59

Die Ergebnisse verdeutlichen, daß insbesondere im Bereich maximaler Solubilisatmengen ein Aufquellen der Doppelschicht zu beobachten ist. Hierbei führt die Einlagerung des Solubilisats in den lipophilen Membranbereich zu einer vertikalen Ausdehnung der Doppelschicht um etwa 1 nm.

In Abbildung 2-12 sind die Bragg-Reflexe im Weitwinkelbereich entsprechend der Untersuchung lamellarer Phasen von DMPC dargestellt. Die Doppelschichten weisen jeweils unterschiedliche Konzentrationen an solubilisiertem Toluol auf. Auffällig sind zwei Charakteristika, die mit steigender Toluolkonzentration in Erscheinung treten: Die Banden werden breiter und zu kleinen Bragg-Winkeln verschoben.

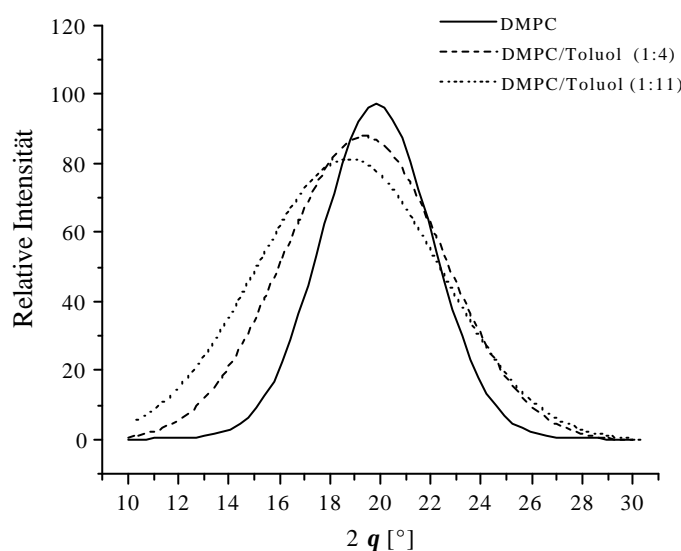


Abbildung 2-12: Intensität und Gestalt der Weitwinkelreflexe lamellarer Phasen von DMPC mit unterschiedlichen Konzentrationen an solubilisiertem Toluol (Angabe entsprechend den Molverhältnissen) bei konstantem DMPC/Wasser-Verhältnis.

Die Bandenverbreiterung ist vermutlich eine direkte Folge der Zunahme der Fluktuationen der L_a -Phase infolge thermisch angeregter Undulationen. Dieses Phänomen ist typisch für Phasen geringer Dimensionalität, wobei die Intensität der gestreuten Strahlung durch ein Potenzgesetz beschrieben werden kann.

Für Wellenvektoren parallel (\parallel) und senkrecht (\perp) zu den Doppelschichten gilt [55]

$$I(q_{\perp} = 0, q_{\parallel}) \propto \frac{1}{|q_{\parallel} - q_o|^{2-h_c}} \quad (2.4)$$

sowie

$$I(q_{\perp}, q_{\parallel} = 0) \propto \frac{1}{q_{\perp}^{4-2h_c}}. \quad (2.5)$$

Hierbei bezeichnet q_o den Wellenvektor der entsprechenden Modulation. Der Exponent h_c berücksichtigt den Einfluß der elastischen Konstanten der Kompression B und der Krümmung k_c der Membran gemäß [56]

$$h_c \propto \frac{1}{\sqrt{Bk_c}}. \quad (2.6)$$

Dieses Potenzgesetz konnte für verschiedene lamellare Systeme bestätigt werden [57,56].

Die in Abbildung 2-12 dargestellte Verschiebung der Maxima der Banden zu kleinen Bragg-Winkeln weist auf die laterale Ausdehnung der Doppelschicht hin und kann ferner als eine Zunahme des lateralen Abstandes der Ketten der Amphiphile innerhalb der Doppelschicht interpretiert werden. Abbildung 2-13 zeigt die Zunahme der Bragg-Abstände des Weitwinkelbereichs als Funktion der Toluolkonzentration. Da die Interaktion des Solubilisats im lipophilen Bereich des Amphiphils erfolgt, sollte ebenfalls ein Anstieg des Packungsparameters P stattfinden. Oberhalb eines Molverhältnisses Toluol/DMPC von etwa 7 bleibt der Abstand konstant und es ist keinerlei signifikante Veränderung der Membrangeometrie in Form einer lateralen Ausdehnung detektierbar. Eine weitere laterale Ausdehnung führt vermutlich zum Auftreten hoher Grenzflächenspannungen im Bereich der Phasengrenze Öl/Wasser, so daß eine Solubilisierung nur noch im Kernbereich zwischen den beiden Monoschichten möglich ist. Das maximale Solubilisierungsvermögen der Doppelschicht sollte jedoch in diesem Bereich nahezu erreicht sein.

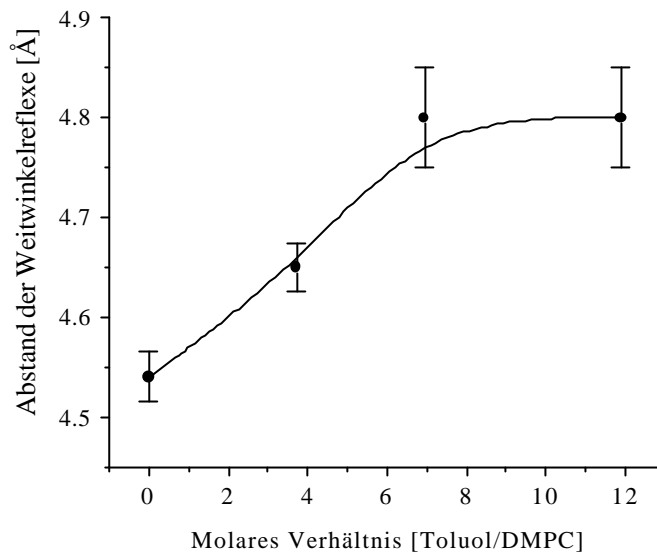


Abbildung 2-13: Verlauf des mittleren Kettenabstandes der Acylreste vollständig hydratisierter lamellarer Phasen von DMPC in Abhängigkeit von der eingelagerten Toluolmenge bei 25°C.

2.3.2 Zusammenfassung

Zusammenfassend zeigen die Untersuchung lamellarer DMPC-Phasen mit Hilfe der Röntgenbeugung, daß die Membrangeometrie nach Solubilisierung von Toluol im lipophilen Membranbereich deutlich beeinflußt wird. Die Einlagerung bewirkt eine Quellung der Membran. Diese erfolgt lateral durch Wechselwirkung des Aromaten mit dem unpolaren Bereich der Acylreste. Die Interkalation des Solubilisats führt effektiv zu einer Erhöhung der inter- sowie intramolekularen Acyl-Acyl-Abstände. Weiterhin ist ein vertikales Ausweichen der Membran in die dritte Dimension im Bereich hoher Toluolkonzentration zu beobachten. Die Membrandicke d_l nimmt um etwa 1 nm (30 %) zu, wobei gleichzeitig eine laterale Ausdehnung der Doppelschicht zu beobachten ist. Dieses Ergebnis zeigt quantitativ eine gute Übereinstimmung mit Untersuchungen der Solubilisierung von Benzol in flüssig-kristallinen DLPC-Doppelschichten mit einem konstanten Wasseranteil von 70 Gew.-% [39].

2.4 Fluoreszenzspektroskopie zur Untersuchung der inneren Eigenschaften der Doppelschicht

Das Studium der Eigenschaften des lipophilen Bereichs der Doppelschicht von Vesikeln wird mit Hilfe hydrophober „Sondenmoleküle“ möglich, die entsprechende spektroskopische Aktivitäten aufweisen. Hierbei sollten die Wechselwirkungen der Sonden mit dem Amphiphil, wie auch die Konzentration an benötigter Reagenz möglichst klein und die Empfindlichkeit des Nachweises entsprechend groß sein. Zur Untersuchung verschiedener Eigenschaften der Doppelschicht von Vesikeln kommen aus diesem Grunde oftmals zur Fluoreszenz befähigte Chromophore zum Einsatz, die in geringer Konzentration in die Membran eingelagert werden können. Die Reagenzien zeigen ein spezifisches, von der jeweiligen Umgebung abhängiges charakteristisches Emissionsspektrum, das mit Hilfe der Fluoreszenzspektroskopie in hoher Empfindlichkeit nachgewiesen werden kann. Auf diese Weise können Informationen über die innere Struktur der Doppelschicht gewonnen werden. Ein häufig verwendetes Chromophor ist Pyren und die entsprechenden Pyrenderivate des Amphiphils [58]. Unter Verwendung dieser Fluoreszenzsonden lassen sich Permeabilitäten, Phasenumwandlungstemperaturen [59], Mikropolaritäten [60,61] sowie Mikroviskositäten [62] von Mizellen und Vesikeln bestimmen.

2.4.1 Monomerfluoreszenz von Pyren als Indikator für die Mikropolarität

Pyren dringt als unpolares Molekül in den lipophilen Bereich der Doppelschicht von Vesikeln ein und liegt dort unterhalb des Glycerinrückgrats in senkrechter Orientierung zur Membranebene vor [41]. Es weist eine im Vergleich zur Phospholipidmatrix hohe laterale Diffusionsgeschwindigkeit ($D = 1.4 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ [63]), aber auch eine transversale Beweglichkeit auf. Nach Anregung mit Licht des ultravioletten Bereiches zeigt Pyren ein Emissionsspektrum mit einer charakteristischen Feinstruktur bestehend aus fünf Schwingungsbanden (I-V). Die relativen Intensitäten dieser Banden werden stark von der Polarität des umgebenden Lösungsmittels beeinflusst [64]. Grund hierfür ist der „Ham-Effekt“ [65], die Verstärkung wenig wahrscheinlicher Übergänge im Bereich symmetrischer, aromatischer Moleküle durch polare Lösungsmittel unter Stabilisierung des angeregten Zustandes. Polare Lösungsmittel verstärken die Intensität des 0-0 Übergangs des Pyren bei $\lambda = 373 \text{ nm}$ (Peak I), während der Übergang bei $\lambda = 383 \text{ nm}$ (Peak III) nahezu unbeeinflusst bleibt [66] (vgl. Abbildung 2-14).

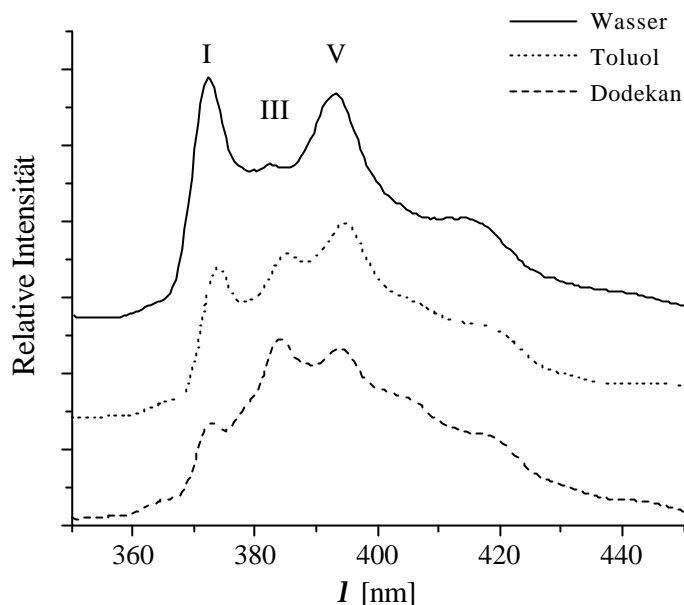


Abbildung 2-14: Vergleich der Monomerfluoreszenz von Pyren ($c = 2.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) in verschiedenen Lösungsmitteln unterschiedlicher Polarität bei einer Temperatur von 25°C nach Anregung bei $\lambda_{\text{Anr.}} = 338 \text{ nm}$. Das Verhältnis der Peaks I und III dient als Maß für die Polarität des Lösungsmittels. Die Peaks II und IV sind nicht aufgelöst.

Das Intensitätsverhältnis von Peak I zu Peak III dient somit zu qualitativen Abschätzung der Polarität des umgebenden Mediums (vgl. Tabelle 2-4).

Tabelle 2-4: Intensitätsverhältnis $I_{\text{I}}/I_{\text{III}}$ der Monomerfluoreszenz von Pyren in verschiedenen Lösungsmitteln und in der Doppelschicht von Vesikeln.

Lösungsmittel	$I_{\text{I}}/I_{\text{III}}$
Wasser	1.56
Toluol	0.96
Dodekan	0.54
DMPC-Vesikel (MLV) ($T < T_m$)	1.13
DMPC-Vesikel (MLV) ($T > T_m$)	1.03

Tabelle 2-4 verdeutlicht den Unterschied des $I_{\text{I}}/I_{\text{III}}$ -Verhältnisses nach Einlagerung von Pyren in die Doppelschicht von Vesikeln. Hierbei ist zu berücksichtigen, daß trotz des hohen Verteilungskoeffizienten von Pyren zwischen der Doppelschicht und der Wasserphase [67] ein gewisser Teil des Chromophors in der Wasserphase gelöst vorliegt. Die Pyrenfluoreszenz in der wäßrigen Phase ist jedoch im Vergleich zu der von solubilisiertem Pyren wesentlich stärker gequencht. Aus diesem Grunde kann der Betrag der Fluoreszenz des Pyren-Anteils in der Wasserphase am Spektrum vernachlässigt werden.

Die Solubilisierung in der Doppelschicht von Vesikeln bewirkt eine Änderung der molekularen Umgebung des Pyren. Diese ist jedoch nicht vergleichbar mit der eines entsprechenden Alkans. Grund hierfür ist, daß das konjugierte π -Elektronensystem des hygroskopischen Pyren innerhalb der Doppelschicht oftmals Wasserstoffbrückenbindungen mit eingelagertem Wasser ausbildet [61]. Ferner ist die Affinität von Pyren zum Kopfgruppenbereich in Phospholipidvesikeln im Gelzustand ($T < T_m$) im Vergleich zu fluiden Vesikeln deutlich erhöht, so daß scheinbar höhere I_I/I_{III} -Verhältnisse ermittelt werden.

Das Intensitätsverhältnis von Peak I zu Peak III von Pyren im lipophilen Bereich der Doppelschicht von Vesikeln liefert Informationen über die Mikropolarität des lipophilen Membranbereichs. Diese sind zumeist qualitativer Natur und nicht ohne weiteres mit Polaritäten von Bulkphasen vergleichbar, liefern jedoch gute Hinweise auf die Struktur der Doppelschicht. Da die Intensität der Fluoreszenz temperaturabhängig ist, müssen vergleichende Messungen bei konstanter Temperatur und zur Vermeidung von Quenchungseffekten in Abwesenheit von Sauerstoff erfolgen.

Mit Hilfe dieser Methode sollte in der Folge der Einfluß eines flüssigen Solubilisats auf die Mikropolarität des lipophilen Bereichs der Doppelschicht von Vesikeln untersucht und qualitativ abgeschätzt werden. Hierzu wurde zunächst die Membran von Phospholipidvesikeln mit kleinen Konzentrationen von Pyren beladen, in Abwesenheit von Sauerstoff mit Toluol titriert und das Intensitätsverhältnis von Peak I zu Peak III der Monomerfluoreszenz ermittelt (vgl. Abbildung 2-15). Bei den Untersuchungen wurden sowohl Phospholipide im Gelzustand (DPPC), als auch im fluiden Zustand (DMPC) verwendet.

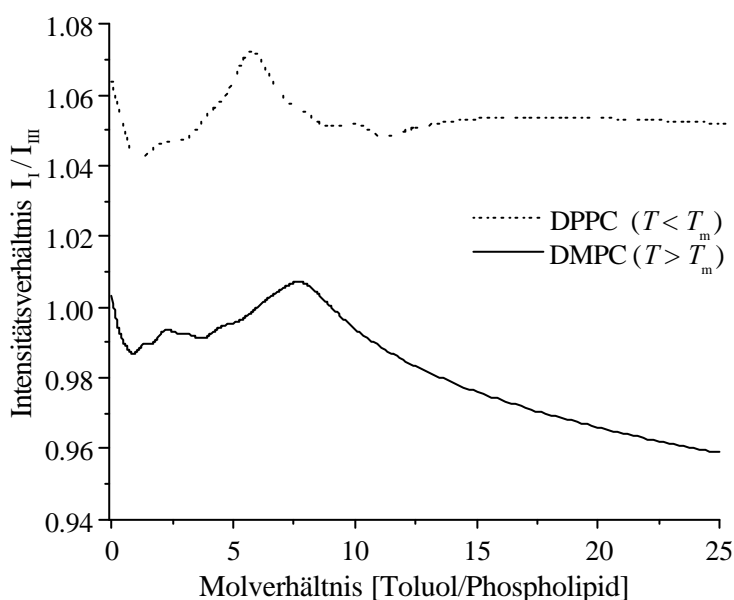


Abbildung 2-15: Verlauf der Intensitätsverhältnisse I_I/I_{III} der Monomerfluoreszenz von solubilisiertem Pyren ($c = 2.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) in Phospholipidvesikeln ($c = 10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) in Abhängigkeit von der eingelagerten Toluolmenge ($I_{\text{Anr.}} = 338 \text{ nm}$ und $T = 25^\circ\text{C}$).

Die Solubilisierung von Toluol im lipophilen Membranbereich bewirkt im Bereich kleiner Konzentrationen eine Abnahme des Intensitätsverhältnisses I_I/I_{III} und entsprechend der Mikropolarität (Abbildung 2-15). Durch den Einfluß von Toluol wird Wasser vermutlich zunehmend aus der Doppelschicht verdrängt und Pyren erhält eine vornehmlich lipophile Umgebung. Die Mikropolarität bleibt in der Folge bis zu einem Molverhältnis (Toluol/Phospholipid) von 5 nahezu konstant. Das Intensitätsverhältnis I_I zu I_{III} fungiert in diesem Fall als Indikator für die Kompaktheit der Kopfgruppe [60]. Bei weiterer Erhöhung der Solubilisatkonzentration kommt es zu einem Quellen der Membran, wobei die Integrität der Kopfgruppen zunehmend verloren geht. Wasser dringt in die Doppelschicht ein und führt zu einem Anstieg der Polarität [66]. Der erneute Abfall des Intensitätsverhältnisses I_I/I_{III} kennzeichnet den Bereich des maximalen Solubilisierungsvermögens der Vesikel, entsprechend einem Molverhältnis von etwa 8 bei DMPC (6 bei DPPC). Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen zeigen, daß es in diesem Konzentrationsbereich zur Phasenseparation von Toluol innerhalb der Doppelschicht der Vesikel kommt. Im Bereich der entstehenden Toluoldomänen kann zudem eine Anreicherung von Pyren beobachtet werden (Abbildung 2-16). Desweiteren konkurriert die Bildung von Emulsionstropfen unter Eintrübung der Dispersion mit der Solubilisierung in Vesikeln. Der Eintrag von Pyren in die Emulsionstropfen konnte ebenfalls fluoreszenzmikroskopisch bestätigt werden.



Abbildung 2-16: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines DMPC-Vesikels ($d = 10.2 \mu\text{m}$) nach Anregung im UV-Bereich. Das Bild verdeutlicht die Anreicherung von Pyren im Bereich phasenseparierten Toluols (heller Bereich) in der Doppelschicht.

2.4.2 Excimerfluoreszenz von Pyren als Indikator für die Mikroviskosität

Pyren zeigt wie einige polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK) in Lösung bei Erhöhung der Konzentration eine Abnahme der Intensität (Quantenausbeute) der Monomerfluoreszenz. Dieser Effekt wird als Konzentrationsquenchung bezeichnet. Er beruht auf der Bildung sogenannter Excimere, d.h. angeregter Dimere. Die Excimerbildung ist eine diffusionskontrollierte, bimolekulare Reaktion. Sie resultiert aus der Wahrscheinlichkeit, daß ein angeregtes Pyrenmolekül mit der Lebensdauer τ eine Face-to-Face-Kollision mit einem Pyren im Grundzustand vollzieht. Dieser Prozeß konkurriert mit der Relaxation in

Form der Monomerfluoreszenz (vgl. Abbildung 2-17) sowie der strahlungslosen Desaktivierung.

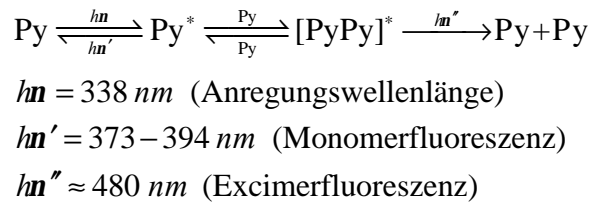


Abbildung 2-17: Fluoreszenzschema der Anregung von Pyren (Py) zum angeregten Molekül Py^* und anschließender Monomer- bzw. Excimerfluoreszenz nach Förster und Kasper [68]. Strahlungslose Desaktivierungen sind unberücksichtigt.

Die Excimerbildung hängt neben der Konzentration im wesentlichen vom Diffusionskoeffizienten D von Pyren und der Viskosität η des Lösungsmittels ab. Das Fluoreszenzspektrum weist ein charakteristisches strukturloses Band auf, welches im Vergleich zur violetten Monomerfluoreszenz bathochrom zu Wellenlängen von 450 nm bis 500 nm (blaue Fluoreszenz) verschoben ist.

Die Solubilisierung von Pyren im lipophilen Membranbereich führt zu einer lokal hohen Konzentration an Pyren und daraus folgend zu einer intensiven Excimerfluoreszenz. Das Verhältnis der Intensitäten der Excimer- zur Monomerfluoreszenz von solubilisiertem Pyren gibt ferner Auskunft über Fluidität des lipophilen Bereichs der Doppelschicht. Hierbei sind die erhaltenen Werte eher qualitativer Natur, da lokale Anreicherungen von Pyren zu einer verstärkten Excimerfluoreszenz aufgrund statischer Mechanismen führen kann [69].

Die Analyse des Einflusses von Toluol auf die Mikrofluidität der Doppelschicht von DMPC-Vesikeln erfolgte unter sukzessiver Erhöhung der Toluolkonzentration (Abbildung 2-18).

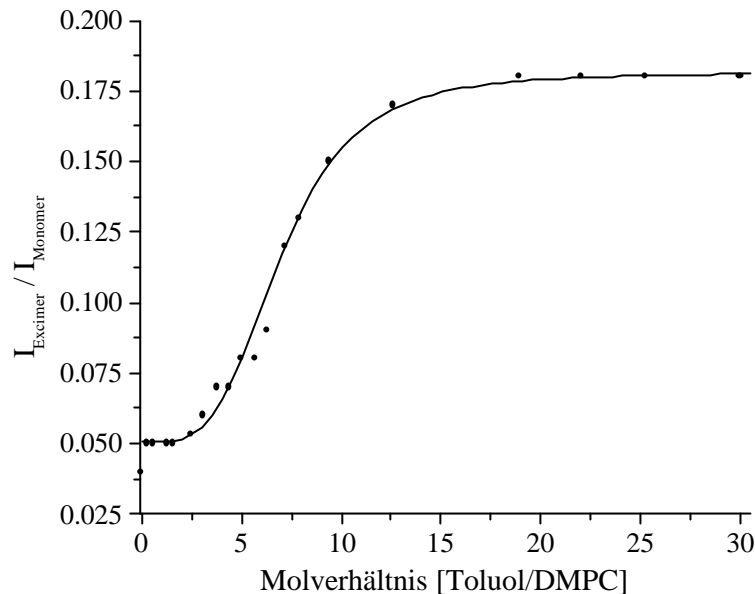


Abbildung 2-18: Intensitätsverhältnis der Excimer- zur Monomerfluoreszenz der Fluoreszenzsonde Pyren ($c = 2.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) in DMPC-Vesikeln in Abhängigkeit von der Toluolkonzentration ($T = 25^\circ\text{C}$).

Abbildung 2-18 zeigt den Verlauf des Intensitätsverhältnisses der Excimer- zur Monomerfluoreszenz als Funktion des Molverhältnisses Toluol/DMPC. Das Verhältnis steigt bei Zugabe von Toluol an und weist in der Folge einen sigmoidalen Verlauf entsprechend einer nahezu konstanten Membranfluidität im Bereich kleiner Solubilisatkonzentrationen auf. Mit steigender Toluolkonzentration ist im Bereich des maximalen Solubilisierungsvermögens der Vesikel ein steiler Anstieg der Excimerfluoreszenz zu beobachten, bis sich im Bereich hoher Toluolkonzentration ein konstantes Verhältnis der Excimer- zur Monomerfluoreszenz einstellt. Die erhöhte Wahrscheinlichkeit der Excimerbildung ist ein deutlicher Indikator für die größere Beweglichkeit des Pyren und respektive die Erniedrigung der Mikroviskosität. Diese beruht im wesentlichen auf der Bildung von toluolreichen Bereichen innerhalb der Doppelschicht. Aus diesem Grund entspricht der Plateauwert bei hoher Solubilisatkonzentration dem Excimer- zu Monomerverhältnis einer Toluolemulsion in Abwesenheit von Phospholipidvesikeln (vgl. Abbildung 2-19).

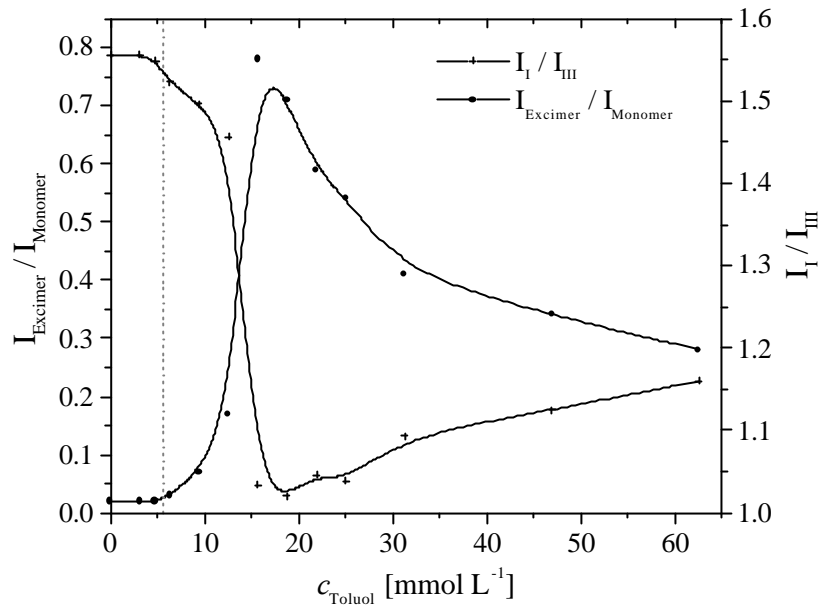


Abbildung 2-19: Intensitätsverhältnisse der Pyrenfluoreszenz nach Titration einer wäßrigen Lösung von Pyren ($c = 2.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) mit Toluol in Abwesenheit eines Amphiphils bei $I_{\text{Anr.}} = 338 \text{ nm}$ und $T = 25^\circ\text{C}$. Die gestrichelte Linie kennzeichnet die Grenze der Wasserlöslichkeit des Toluol, wobei bei einer Erhöhung der Toluolkonzentrationen die Bildung einer O/W-Emulsion beobachtbar wird.

2.4.3 Zusammenfassung

Die fluoreszenzspektroskopischen Untersuchungen der Solubilisierung von Toluol erfolgten unter Verwendung von Pyren als „Fluoreszenzsonde“. Diese Untersuchungen zeigen eine veränderte Polarität im inneren Membranbereich mit steigender Toluolkonzentration, ein Effekt, der auf das Eindringen von Wasser in den lipophilen Membranbereich hindeutet. Hierdurch wird die abnehmende Kompaktheit der Kopfgruppe unter dem Einfluß des lipophilen Solubilisats bestätigt. Desweiteren führt die Bildung toluolreicher Bereiche innerhalb der Vesikel zu einem deutlichen Anstieg der lateralen Mobilität der „Fluoreszenzsonde“ innerhalb der Doppelschicht. Im Bereich hoher Toluolkonzentration wird die Interpretation der Ergebnisse schwierig, da Phasenseparation innerhalb der Doppelschicht auftreten und die Bildung einer O/W-Emulsion konkurriert.

3 Thermotrope Eigenschaften von Vesikeln

3.1 Dynamische Differenzkalorimetrie

Die dynamische Differenzkalorimetrie (Differential Scanning Calorimetry, DSC) ist ein empfindliches Instrumentarium zur Charakterisierung kooperativer Änderungen, wie sie im Bereich des thermotropen Verhaltens von Lipiden zu beobachten sind. Die Methode der Leistungskompensations-DSC beruht auf einem recht simplen Prinzip: Die Temperatur der Probe und einer inerten Referenz werden separat linear mit identischen, differentiellen Temperaturraten verändert, wobei der Temperaturunterschied zwischen Probe und Referenz konstant gehalten wird. Die Differenz der Wärmeströme wird registriert und als Funktion der Proben temperatur aufgetragen. Treten in der Probe temperaturabhängige Umwandlungen auf, so resultieren unterschiedliche Wärmeströme, deren Differenz in Form eines Signals aufgezeichnet wird. Die von der Probe aufgrund einer Phasenumwandlung abgegebene oder aufgenommene Wärme (Phasenumwandlungsenthalpie ΔH) ist hierbei der Peakfläche direkt proportional. Mit Hilfe der DSC ist es nunmehr möglich, den Einfluß lipophiler Solubilisate auf das thermotrope Verhalten der Diacylphospholipide zu charakterisieren [70,71]. Hierzu sollen vorab einige Grundlagen der Kalorimetrie erläutert werden.

3.1.1 Grundlagen der Kalorimetrie

Wird die Temperatur eines Systems erhöht, so werden sukzessive energetisch höher gelegene Zustände besetzt. Dieser Effekt ist in den Bereichen maximal, in denen das System eine kooperative Strukturänderung vollzieht. Unter der Annahme, daß ein System zwei unterschiedliche, diskrete Zustände **A** und **B** annehmen kann, folgt für die Änderung der Standard-Gibbs-Energie der Umwandlung von **A** in **B**

$$\Delta G^0 = \Delta H^0 - T\Delta S^0 = -RT \ln K. \quad (3.1)$$

Hierbei sind ΔH^0 und ΔS^0 die Änderungen der Standard-Enthalpie sowie -Entropie der Reaktion. Mit a , dem Anteil von **A**, gilt für die Gleichgewichtskonstante K

$$K = \frac{[\mathbf{B}]}{[\mathbf{A}]} = \frac{a}{(1-a)}, \quad (3.2)$$

wobei

$$a = \frac{[\mathbf{A}]_0}{[\mathbf{A}]_t - [\mathbf{A}]_0}. \quad (3.3)$$

Im Bereich der Phasenumwandlung koexistieren beide Phasen **A** und **B** bei der Umwandlungstemperatur T_m zu gleichen Anteilen ($\Delta G^0 = 0$). Somit gilt

$$T_m = \frac{\Delta H_m^0}{\Delta S_m^0}. \quad (3.4)$$

Die Enthalpieänderung ΔH_{cal} kann gemäß Abbildung 3-1 aus der Fläche zwischen der DSC-Kurve und der Basislinie ermittelt werden. Mit \dot{Q} , dem Wärmestrom ($\dot{Q} = dQ \cdot dt^{-1}$), folgt

$$\Delta H_{\text{cal}} = \int_{T_1}^{T_2} \dot{Q} dT. \quad (3.5)$$

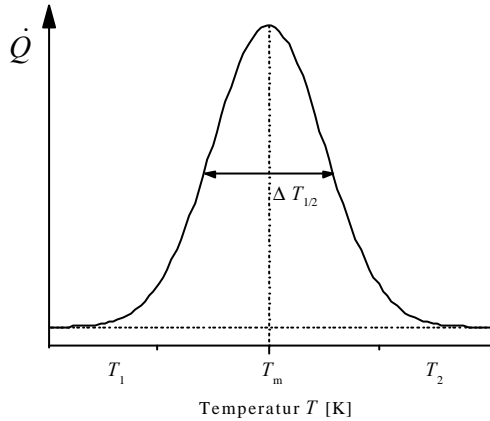


Abbildung 3-1: Schematische Darstellung des Thermogramms eines endothermen Prozesses $A \rightleftharpoons B$. **A** und **B** weisen gleiche Wärmekapazitäten auf ($\Delta c_p = 0$). Die Kurve besitzt ein Maximum bei der Übergangstemperatur T_m und wird durch die Halbwertsbreite $\Delta T_{1/2}$ (Peakbreite bei halber Höhe) charakterisiert. T_1 und T_2 kennzeichnen die Temperatur zu Beginn und nach Beendigung des Prozesses.

Die Phasenumwandlung der Lipide erfolgt in Form eines kooperativen Prozesses, wobei sich Gruppen von Molekülen simultan umwandeln. Die Anzahl der Moleküle N der kooperativen Einheit ist hierbei ein Maß für den Grad der intermolekularen Kooperation zwischen den Phospholipidmolekülen einer Doppelschicht. Je enger der Temperaturbereich, in der die Umwandlung stattfindet, desto größer wird folglich N .

Die van't-Hoff-Gleichung zur Beschreibung der Temperaturabhängigkeit der Gleichgewichtskonstante K

$$\left(\frac{\partial \ln K}{\partial T} \right)_p = \frac{\Delta H_{\text{vH}}}{RT^2} \quad (3.6)$$

ermöglicht die Berechnung einer scheinbaren Reaktionsenthalpie ΔH_{vH} , die mit zunehmender Größe der kooperativen Einheiten ansteigt. Diese kann näherungsweise zum Zeitpunkt der Hälfte der Umwandlung ($a = 1/2$) bei T_m bestimmt werden nach [71]

$$\left(\frac{\partial a}{\partial T} \right)_{T_m} = \frac{\Delta H_{\text{vH}}}{4RT_m^2}. \quad (3.7)$$

Die Anzahl der Moleküle der kooperative Einheit N ergibt sich aus dem Verhältnis der van't-Hoff-Enthalpie ΔH_{vH} und der kalorimetrisch ermittelten Enthalpie ΔH_{cal} [71,72] gemäß

$$N = \frac{\Delta H_{\text{vH}}}{\Delta H_{\text{cal}}} \cong 4RT_m^2 \cdot \frac{\dot{Q}_{\text{max}}}{\Delta H_{\text{cal}}^2}, \quad (3.8)$$

wobei \dot{Q}_{max} dem Maximum der Wärmekapazität bei der Hälfte der Umwandlung ($T = T_m$) entspricht. Hierbei bezeichnet $N = 1$ einen nicht-kooperativen Prozeß.

3.1.2 Thermotropes Verhalten der Phospholipide

Die untersuchten synthetischen 1,2-Diacylphosphatidylcholine zeigen eine Reihe charakteristischer, endothermer Phasenumwandlungen innerhalb definierter Temperaturbereiche [73]. Die Form und Lage der Peaks im Thermogramm ist in signifikanter Weise von der Struktur und Packung des Lipids in der Aggregatform abhängig. Hierbei ist zu beachten, daß die Lage ebenfalls von der aufgewendeten Heizrate abhängig ist. Abbildung 3-2 zeigt das Thermogramm multilamellarer 1,2-Dipalmitoylphosphatidylcholin-Vesikel nach Temperierung über einen Zeitraum von 4 Tagen bei 4°C. Dieses weist drei charakteristische Phasenumwandlungen auf und erlaubt die Unterscheidung zwischen der kristallinen L_c -Phase, der Gelphasen $L_{b'}$ und $P_{b'}$ sowie der fluiden L_a -Phase.

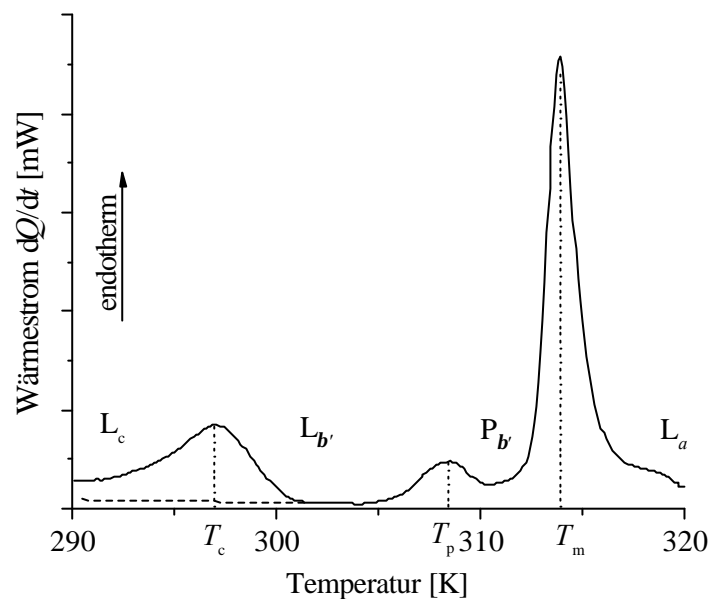


Abbildung 3-2: Thermogramm einer wäßrigen Dispersion multilamellarer Dipalmitoylphosphatidylcholin-Vesikel (DPPC) entsprechend einer Heizrate von $5 \text{ K} \cdot \text{min}^{-1}$ zur Erläuterung des thermotropen Polymorphismus. Die endothermen Peaks sind charakteristisch für die jeweilige Phasenumwandlung. Die Bildung der kristallinen L_c -Phase ist vermutlich kinetisch gehemmt, so daß der Übergang bei wiederholter Messung (gestrichelte Linie) nicht mehr beobachtbar ist.

Die Subgel-Umwandlung $L_c \rightarrow L_{b'}$ (*engl. subtransition*) erfolgt bei den untersuchten DPPC-Vesikeln bei einer Heizrate von $5 \text{ K} \cdot \text{min}^{-1}$ bei $T_c = 23.5^\circ\text{C}$. Dieser Übergang ist unter herkömmlichen Präparationsbedingungen nicht detektierbar, da die Bildung der kristallinen Subgelphase L_c sehr langsam erfolgt und vermutlich kinetisch gehemmt ist [74]. Die Darstellung der L_c -Phase erfolgte hierzu unter speziellen in Kapitel 10 beschriebenen Bedingungen [72].

Die Vorumwandlung $L_{b'} \rightarrow P_{b'}$ (*engl. pretransition*) bei $T_p = 35.4^\circ\text{C}$ kennzeichnet einen verhältnismäßig langsamen Prozeß mit einer der Hauptumwandlung vergleichbaren Kooperativität. Die Umwandlung ist sehr empfindlich auf grenzflächenaktive Solubilisate, kann jedoch nur qualitativ zur Charakterisierung vesikulärer Systeme herangezogen werden, da sie sehr stark von der verwendeten Heizrate abhängt [70]. Die Werte von ΔH_p sind nahezu unabhängig von der Kettenlänge der Fettsäurereste des Phospholipids [73].

Die Hauptumwandlung ($P_{b'} \rightarrow L_a$) (*engl. maintransition*) von der Gel- zur flüssig-kristallinen Phase ist ein im Vergleich zu den anderen Umwandlungen schneller Prozeß. Dieser wird als scharfer, symmetrischer Peak im Thermogramm bei einer Temperatur $T_m = 41.4^\circ\text{C}$ detektiert. Die Phasenumwandlung entspricht thermodynamischen Gleichgewichtsbedingungen und kann quantitativ zur Charakterisierung der kolloidalen Struktur herangezogen werden. Die Umwandlungstemperatur T_m und die Enthalpieänderung ΔH_m zeigen eine deutliche Abhängigkeit von der Länge und dem Sättigungsgrad der Fettsäurereste sowie der Art und Zusammensetzung der Kopfgruppe des Amphiphils. Aber auch die Vesikelform und Größe hat einen deutlichen Einfluß, da die jeweilige Membrankrümmung das Ausmaß der van-der-Waals-Wechselwirkungen im lipophilen Bereich bestimmt [75].

3.1.3 Einfluß lipophiler Solubilisate auf die thermotropen Eigenschaften

Das thermotrope Verhalten von Vesikeln wird im wesentlichen durch Wechselwirkungen des Amphiphils im lipophilen Bereich der Doppelschicht dominiert. Aus diesem Grunde kann die Einlagerung lipophiler Solubilisate sehr sensitiv detektiert werden. Da jedoch die Aggregationsform der Phospholipide das Phasenverhalten ebenfalls entscheidend prägt, gilt es zunächst, diesen Einfluß zu analysieren.

3.1.4 Kalorimetrische Untersuchung der Wechselwirkung lipophiler Substanzen mit Phospholipidvesikeln

3.1.4.1 Einfluß der Struktur der Vesikel auf die Phasenumwandlungstemperatur

Das thermotrope Verhalten reiner Diacylphosphatidylcholine wird wesentlich durch die Präparationsbedingungen der Vesikel beeinflusst, ein Punkt, der für die vergleichenden Untersuchungen des Solubilisateinflusses berücksichtigt werden muß.

Abbildung 3-3 zeigt die Beeinflussung der Phasenumwandlungstemperatur T_m der Hauptumwandlung von der Gel- zur flüssig-kristallinen Phase unter dem Einfluß von Toluol für unterschiedlich dargestellte unilamellare Vesikel.

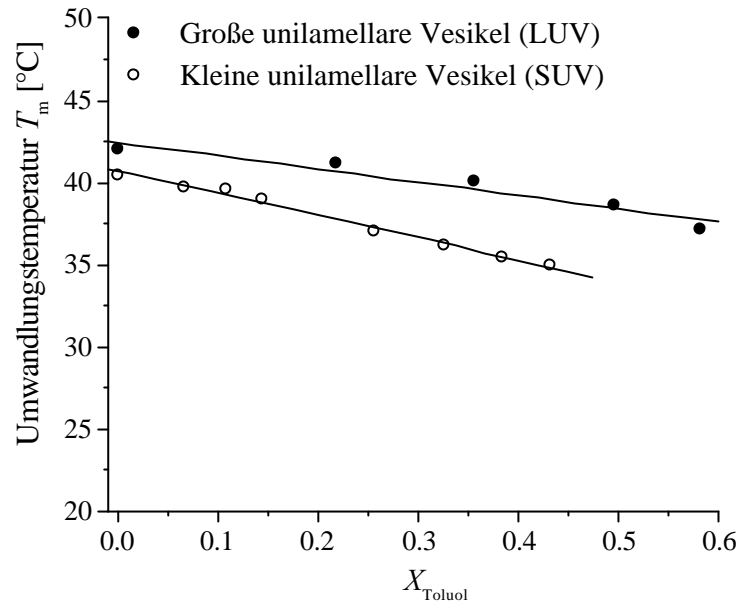


Abbildung 3-3: Einfluß der Größe von DPPC-Vesikeln auf die Phasenumwandlungstemperatur T_m in Abhängigkeit des Molenbruchs von Toluol. Große unilamellare Vesikel (LUV) mit Durchmessern $d > 100$ nm wurden mit Hilfe der Extrudertechnik unter Verwendung einer Polycarbonatmembran mit einer Porengröße von 400 nm dargestellt. Die Darstellung kleiner unilamellarer Vesikel (SUV) mit Durchmessern $d < 80$ nm erfolgte mittels der Ultraschallmethode.

Bei der Betrachtung der unbeladenen Vesikel wird bereits die Anomalie im Verhalten kleiner unilamellarer, mittels Ultraschall dargestellter Vesikel (SUV) im Vergleich zu großen Vesikeln (LUV) deutlich. Die mittels Ultraschall dargestellten Vesikel (SUV) zeigen aufgrund der starken Membrankrümmung in reiner Form eine erniedrigte Phasenumwandlungstemperatur T_m sowie eine kleinere Enthalpiedifferenz ΔH_m , wobei die Kooperativität der Hauptumwandlung im wesentlichen unbeeinflusst bleibt [75]. Desweiteren wird die Phasenumwandlung $L_b' \rightarrow P_b'$ oftmals unterdrückt.

Unter dem Einfluß von Toluol erfolgt sowohl bei Verwendung großer, als auch kleiner unilamellarer Vesikel eine Erniedrigung der Umwandlungstemperatur $T_{m,0}$ mit steigender Konzentration. Im Bereich kleiner Molenbrüche des lipophilen Solubilisats entspricht der nahezu lineare Verlauf einer Gefrierpunktserniedrigung verdünnter Lösungen gemäß

$$T_m = T_{m,0} - \frac{RT_{m,0}^2}{\Delta H_m} \cdot X_{\text{Solubilisat}} \quad (3.9)$$

Dieses Phänomen wird oftmals bei der Solubilisierung lipophiler Substanzen in Vesikeln wie beispielsweise im Falle von Lindan beobachtet [76].

Das Ausmaß der Erniedrigung der Umwandlungstemperatur zeigt weiterhin eine starke Abhängigkeit von der Aggregatstruktur. Die Erniedrigung ist umso ausgeprägter je höher die Krümmung innerhalb der Packung bzw. je kleiner die Umwandlungsenthalpie ΔH_m ist. Dies

belegt, daß die Lipidphase nur unzureichend durch Bulkphasenmodelle beschrieben werden kann, da die Natur der Doppelschicht sehr stark durch intrinsische Packungseigenschaften dominiert wird. Das Solubilisierungsvermögen kleiner Vesikel ist aufgrund dieser Packungsrestriktionen vermutlich im Vergleich zu den größeren Pendants eingeschränkt.

Ein Vergleich großer unilamellarer Vesikel (LUV) mit multilamellaren Strukturen (MLV) weist demgegenüber keinerlei signifikante Unterschiede im thermotropen Verhalten auf, so daß von ähnlichen Verhältnissen im Bereich der Membrankrümmungen ausgegangen werden kann.

Die Kettenlänge der Fettsäurereste der verwendeten Lecithine prägt ebenso die thermotropen Eigenschaften großer Vesikel. Tabelle 3-1 zeigt die ermittelten Daten der Phasenumwandlung zweier Diacylphospholipide mit unterschiedlichen Acylresten. Im Bereich der Hauptumwandlung ($P_{b'} \rightarrow L_a$) wird der Anstieg der Umwandlungstemperatur T_m mit zunehmender Kettenlänge deutlich, der für Diacyllecithine nahezu linear mit steigender Kettenlänge erfolgt [73]. Ferner steigt die Umwandlungsenthalpie ΔH_m um etwa $5 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ pro Methylengruppe.

Tabelle 3-1: Ermittelte kalorimetrische Daten der Phasenumwandlungen großer unilamellarer Phospholipidvesikel (LUV) mit unterschiedlichen Fettsäureresten.

Parameter	DMPC		DPPC		
	$L_{b'} \rightarrow P_{b'}$	$P_{b'} \rightarrow L_a$	$L_c \rightarrow L_{b'}$	$L_{b'} \rightarrow P_{b'}$	$P_{b'} \rightarrow L_a$
$T [^{\circ}\text{C}]$	14.5	23.8	23.5	35.4	41.4
$\Delta H [\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}]$	3.6	24.9	12.7	8.0	35.4
$\Delta S [\text{J} \cdot (\text{mol K})^{-1}]$	12	84	41	26	112

Auch das Ausmaß der Beeinflussung der thermotropen Eigenschaften durch ein lipophiles Solubilisat ist abhängig von der Kettenlänge des Diacylphosphatidylcholin. Abbildung 3-4 zeigt die nahezu lineare konzentrationsabhängige Erniedrigung der Umwandlungstemperatur T_m der Hauptumwandlung durch die Solubilisierung von Toluol. Die Abnahme von T_m ist bei DMPC, dem Phospholipid mit der geringeren Kettenlängen, gegenüber DPPC geringfügig größer.

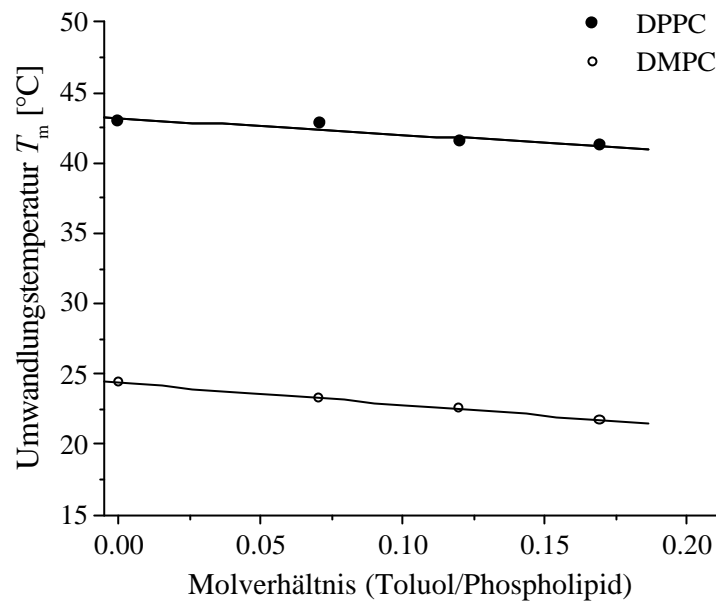


Abbildung 3-4: Vergleich des Einflusses von Toluol auf die Phasenumwandlungstemperatur T_m ($P_b \rightarrow L_a$) großer unilamellarer Vesikel (LUV) im Bereich kleiner Solubilisatkonzentrationen.

3.1.4.2 Einfluß aromatischer Solubilisate auf die Hauptumwandlung

Die Charakterisierung des Einflusses verschiedener lipophiler, aromatischer Solubilisate auf das thermotrope Verhalten erfolgte anhand von großen DPPC-Vesikeln. Diese können über einen hinreichend großen Temperaturbereich untersucht werden. Zum Zweck der exakteren Reproduzierbarkeit der Ergebnisse wurden die Vesikel mit Hilfe der Extrudertechnik dargestellt. Der Einfluß unterschiedlicher aromatischer Solubilisate auf die Umwandlungstemperatur T_m der Hauptumwandlung der Vesikel ist quantitativ in Abbildung 3-5 dargestellt.

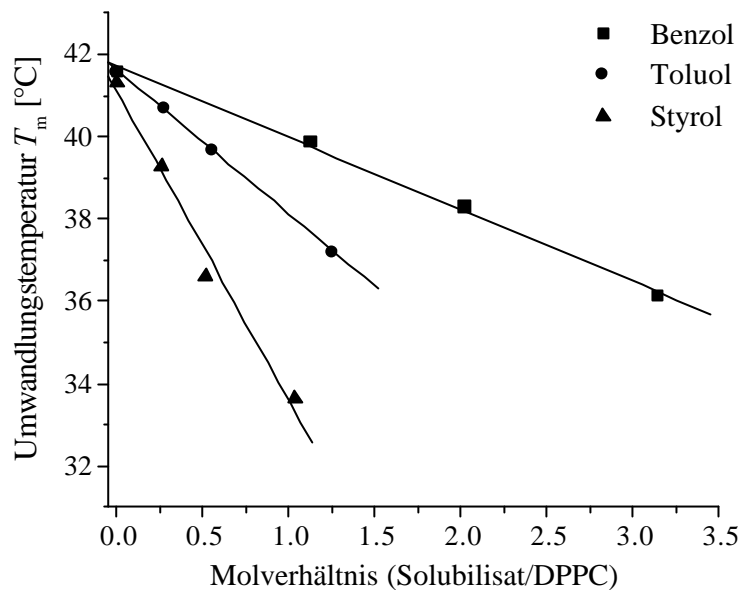


Abbildung 3-5: Verlauf der Umwandlungstemperatur T_m der Hauptumwandlung großer unilamellarer DPPC-Vesikel (LUV) unter dem Einfluß verschiedener lipophiler Solubilisate.

Die konzentrationsabhängige Erniedrigung der Umwandlungstemperatur T_m wird gemäß Abbildung 3-5 deutlich von der Natur der solubilisierten lipophilen Substanz beeinflusst. Hierbei spielen die unterschiedlichen Affinitäten des Solubilisats zum Kopfgruppenbereich der Amphiphile sowie Unterschiede in den Verteilungskoeffizienten der Solubilisate zwischen der Wasserphase und der Doppelschicht eine Rolle. Weiterhin erfolgt durch die Einlagerung der lipophilen Substanz in die Doppelschicht eine Erniedrigung des chemischen Potentials m_G der Gelphase bzw. m_f der fluiden Phase. Der Betrag dieser Erniedrigung ist jedoch nicht für jede Phase gleich. Die Löslichkeit der lipophilen Substanz ist in der Gelphase als Folge des niedrigen zur Solubilisierung zur Verfügung stehenden freien Volumens innerhalb der Doppelschicht deutlich geringer. Die Einlagerung führt somit zu einer vergleichsweise stärkeren Beeinflussung von m_G . Als Folge sinkt die Umwandlungstemperatur T_m . Der jeweilige Einfluß auf die chemischen Potentiale zeigt wiederum eine deutliche Abhängigkeit von der Natur des lipophilen Solubilisats [77].

Die Untersuchungen zeigen ferner eine deutliche Verbreiterung des Temperaturbereichs der Hauptumwandlung nach Einlagerung lipophiler Solubilisate. Der konzentrationsabhängige Einfluß wird in Abbildung 3-6 durch die nahezu lineare Zunahme der Halbwertsbreite $\Delta T_{1/2}$ mit steigender Solubilisatkonzentration deutlich. Zum Vergleich ist weiterhin der Einfluß von Phenol, welches überwiegend im Kopfgruppenbereich lokalisiert ist, dargestellt.

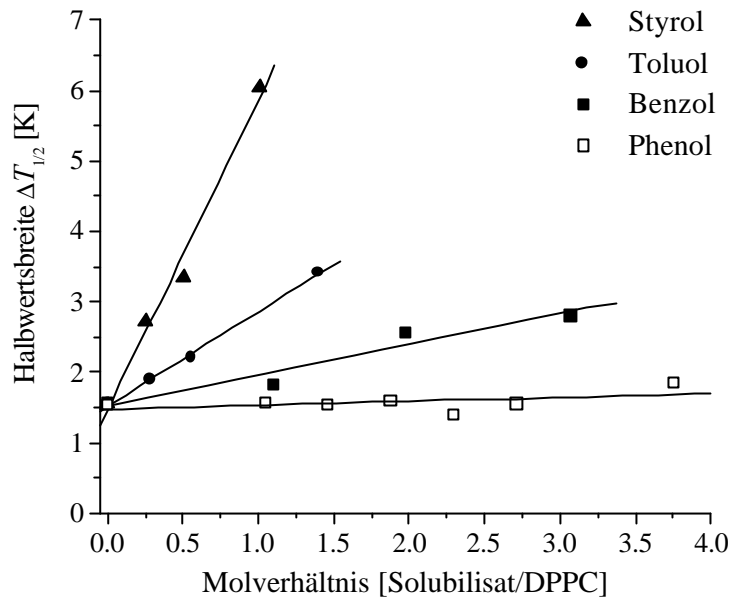


Abbildung 3-6: Halbwertsbreite $\Delta T_{1/2}$ der endothermen Umwandlung von der Gelphase in die flüssig-kristalline Phase von DPPC-Vesikeln (LUV) unter dem Einfluß verschiedener lipophiler Solubilisate mit unterschiedlicher Affinität zum Kopfgruppenbereich von DPPC.

Die Zunahme der Halbwertsbreite $\Delta T_{1/2}$ nach Solubilisierung lipophiler Substanzen deutet auf eine sinkende Kooperativität der Umwandlung. Der Vergleich der unterschiedlichen Solubilisate zeigt, daß mit steigendem Raumbedarf bedingt durch den jeweils unterschiedlichen Substituenten am aromatischen System die Beeinflussung der thermotropen Eigenschaften der Vesikel verstärkt wird. Dies ist einerseits eine Folge des unterschiedlichen Platzbedarfs der Moleküle innerhalb der Membran. Andererseits spielt insbesondere die Lokalisierung des jeweiligen Solubilisats eine entscheidende Rolle [78]. Je höher die Affinität des Solubilisats zum Kopfgruppenbereich ist, desto geringer ist der Einfluß auf den lipophilen Bereich der Doppelschicht und folglich der Einfluß auf die Kooperativität des Übergangs.

Der bereits diskutierte unterschiedliche Einfluß des Solubilisats auf die Gel- bzw. die fluide Phase des Phospholipids wird ferner durch die Erniedrigung der Umwandlungsenthalpie ΔH_m nach Solubilisierung deutlich und ist in Abbildung 3-7 dargestellt.

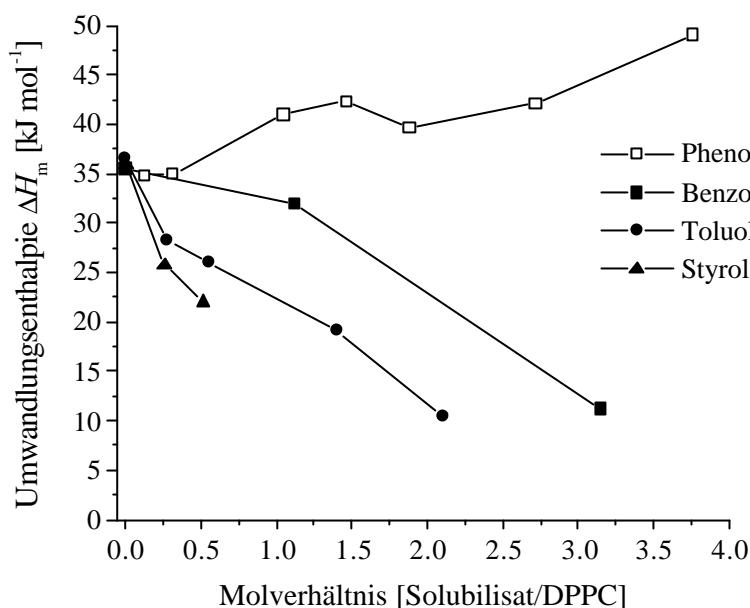


Abbildung 3-7: Verlauf der Umwandlungsenthalpie ΔH_m der Hauptumwandlung großer unilamellarer DPPC-Vesikel (LUV) in Abhängigkeit von der Solubilisatmenge.

Die Erniedrigung der Umwandlungsenthalpie ΔH_m kann analog den erniedrigten Enthalpiedifferenzen von kleinen Vesikeln (SUV) durch veränderte Packungseigenschaften begründet werden [75]. Die van-der-Waals-Wechselwirkungen der Phospholipidmoleküle in der fluiden Phase des reinen Systems sind vergleichsweise geringer als die der Gelphase. Die Enthalpie des Übergangs vom Gelzustand zur fluiden Phase ist somit im wesentlichen eine Folge der Reduktion dieser intermolekularen Wechselwirkungen im lipophilen Bereich der Doppelschicht. Das lipophile Solubilisat hat jedoch unterschiedlichen Einfluß auf die Enthalpie H der einzelnen Phasen. Die intermolekularen Wechselwirkungen und somit auch die Enthalpie H_{fluid} der fluiden Phase werden nur schwach beeinflusst, da diese Phase genügend freies Volumens zur Solubilisierung aufweist. Die intermolekularen Amphiphilwechselwirkungen der Gelphase sowie die Enthalpie H_{gel} werden hingegen vergleichsweise stärker beeinflusst. Folglich ist der Betrag der Enthalpiedifferenz zwischen unbeladenen und beladenen Vesikeln für die Gelphase deutlich höher. Resultierend sinkt die kalorimetrisch beobachtbare Enthalpie- sowie die Entropiedifferenz des Phasenübergangs. Mit ansteigender Lipophilie und zunehmendem Raumbedarf des Solubilisats gleichen sich die Phasen mehr und mehr an, so daß im Falle hoher Solubilisatmenge ein Phasenübergang kaum noch detektierbar ist. Grenzflächenaktive Solubilisate wie Phenol können ferner eine Erhöhung der Umwandlungsenthalpie ΔH_m bewirken. Diese resultiert vermutlich aus der selektiven Erhöhung der Orientierung der Phospholipide in der Gelphase. Tabelle 3-2 verdeutlicht den generellen Trend der Beeinflussung der thermotropen Eigenschaften durch die Struktur des Solubilisats.

Tabelle 3-2: Übersicht der ermittelten kalorimetrischen Daten multilamellarer DPPC-Vesikel (MLV) unter dem Einfluß lipophiler Solubilisate bei einem Molverhältnis Solubilisat/DPPC von 1:2.

Parameter	Phenol	Benzol	Toluol	Cumol	Styrol	<i>o</i> -Xylol	Hexylbenzol
$\Delta T_{1/2}$ [K]	1.6	1.7	2.2	2.9	3.4	3.8	4.0
T_m [°C]	36.5	40.5	39.5	38.5	37.5	37.0	37.5
ΔH_m [kJ·mol ⁻¹]	36.3	31.9	26.4	25.5	21.9	21.1	27.3
ΔS_m [J·(mol K) ⁻¹]	117	102	84	82	70	68	88

Die Symmetrie des Signals der Hauptumwandlung liefert ferner Informationen über die jeweilige zur Solubilisierung bevorzugte Phase. So zeigt der Vergleich der Umwandlung nach Solubilisierung von Phenol und Styrol deutliche Unterschiede (Abbildung 3-8). Die beobachtbaren Signale weisen eine ausgeprägte Asymmetrie auf. Der Peak ist im Falle von Phenol im Gegensatz zu Styrol im Bereich hoher Temperaturen verbreitert.

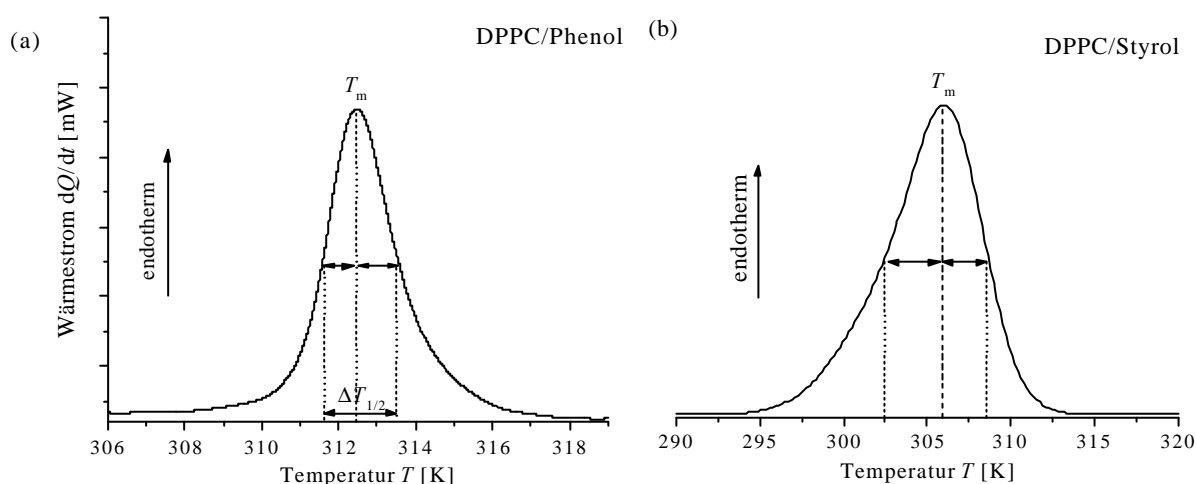


Abbildung 3-8: Einfluß unterschiedlicher Solubilisate auf die Symmetrie der Signale des endothermen Übergangs von der Gel- zur flüssig-kristallinen Phase multilamellarer DPPC-Vesikel (MLV): (a) Das Signal ist nach Einlagerung von Phenol (Molverhältnis 0.12) unsymmetrisch und zeigt eine Verbreiterung im Bereich hoher Temperaturen. Die Einlagerung von Styrol führt hingegen zu einer Verbreiterung im Bereich tiefer Temperaturen (b).

Grund hierfür ist vermutlich die Einlagerung von Phenol in die Gelphase des Lipids, ein Effekt, der bei grenzflächenaktiven Solubilisaten beobachtet werden kann [43]. Die Solubilisierung der BTX-Aromaten findet hingegen bevorzugt in der fluiden Phase des Phospholipids statt.

3.1.4.3 Einfluß aromatischer Solubilisate auf die Vorumwandlung

Der Unterschied zwischen den betrachteten lipophilen Substanzen und polaren Verbindungen wie Phenol mit hoher Affinität zur Kopfgruppe auf die Vorumwandlung ($L_b \rightarrow P_b$) wird bereits im Bereich kleiner Konzentrationen deutlich. Das Signal der Umwandlung verschwindet im Falle der Einlagerung von Phenol schon bei Molverhältnissen Phenol/DPPC von 1:10, während im Bereich der BTX-Aromaten hierzu molare Überschüsse des Solubilisats nötig sind. Substanzen mit hoher Affinität zur Kopfgruppe führen somit bereits in kleinsten Konzentrationen zur Unterdrückung der Bildung der P_b -Phase, wobei vermutlich die Orientierung der Kopfgruppe durch das senkrecht zur Membranebene eingelagerte Solubilisat beeinflusst wird.

3.1.5 Detaillierte Betrachtung des Phasenverhaltens am Beispiel Toluol/DPPC

Im folgenden soll das Phasenverhalten von DPPC-Vesikeln in Abhängigkeit von solubilisiertem Toluol einer detaillierten Betrachtung unterzogen werden. Die entsprechenden Thermogramme sind in Abbildung 3-9 dargestellt. Diese stimmen qualitativ mit dem Verlauf des Systems Toluol/DMPC überein.

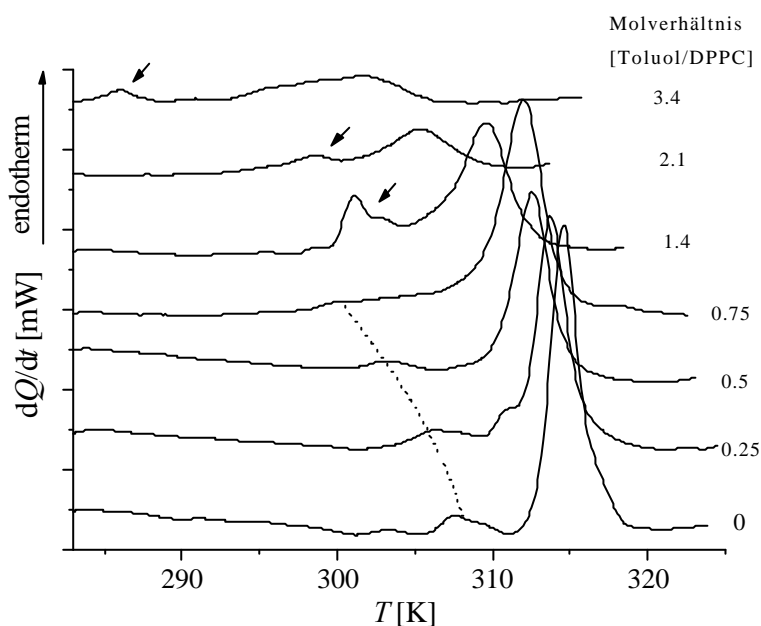


Abbildung 3-9: Thermogramme großer unilamellarer DPPC-Vesikel ($c = 35 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) in Abhängigkeit von solubilisiertem Toluol bei einer Heizrate von $5 \text{ K} \cdot \text{min}^{-1}$. Die scharfen Signale repräsentieren die Hauptumwandlung, die weniger ausgeprägten die Vorumwandlung (gepunktete Linie). Im Bereich hoher Toluolkonzentrationen tritt neben einer deutlichen Peakverbreiterung der Hauptumwandlung ein neues Signal auf (Markierung mittels Pfeil). Dieses entspricht vermutlich der Hauptumwandlung einer toluolreichen Lipidphase.

Die detaillierte Betrachtung des Phasenverhaltens verdeutlicht die Erniedrigung der Temperatur sowohl im Bereich der Haupt-, wie der Vorumwandlung mit steigender Solubilisatkonzentration. Im Bereich äquimolarer Konzentrationen verschwindet das Signal der Vorumwandlung gänzlich.

Die Analyse der Kooperativität der Hauptumwandlung gemäß Gleichung (3.8) ist für steigende Toluolkonzentrationen in der Doppelschicht in Abbildung 3-10 dargestellt.

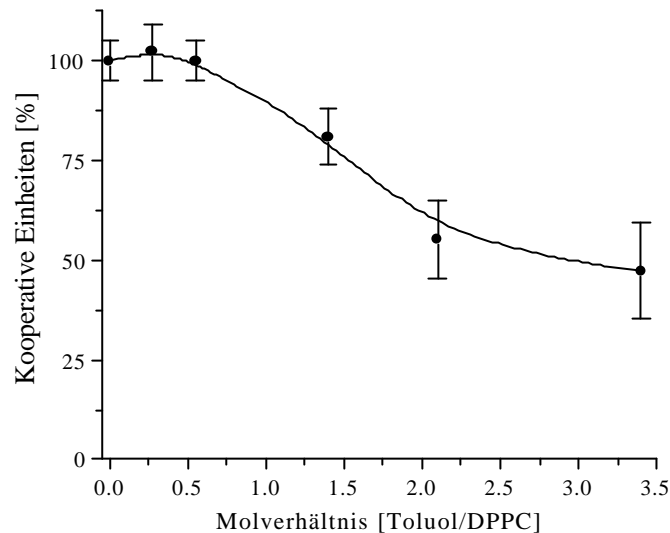


Abbildung 3-10: Verlauf der kooperativen Einheiten nach Gleichung (3.8) für die Phasenumwandlung von der Gelphase in die flüssig-kristalline Phase bei T_m als Funktion der solubilisierten Toluolmenge. Der Bereich maximaler Kooperativität entspricht etwa einer Größe von 215 Phospholipidmolekülen.

Hierbei zeigt sich auffällig, daß die Größe der kooperativen Einheiten bei kleiner Toluolkonzentration nahezu unbeeinflusst bleibt und erst oberhalb äquimolarer Konzentrationen deutlich absinkt. Dies kann als Hinweis für eine Koexistenz einer reinen L_a -Phase und einer toluolhaltigen L_{oa} -Phase gewertet werden, wobei mit steigender Toluolkonzentration die Bereiche reinen Lipids zugunsten der L_{oa} -Phase abnehmen.

Auf der Basis der kalorimetrischen Daten kann somit für den Bereich kleiner bis mittlerer Solubilisatkonzentration ein Temperatur-Zusammensetzungs-Diagramm in Form eines „Phasendiagramms“ konstruiert werden (Abbildung 3-11). Dieses liefert im Bereich kleiner Solubilisatkonzentrationen Analogien zum Phasendiagramm DPPC/Cholesterin [79].

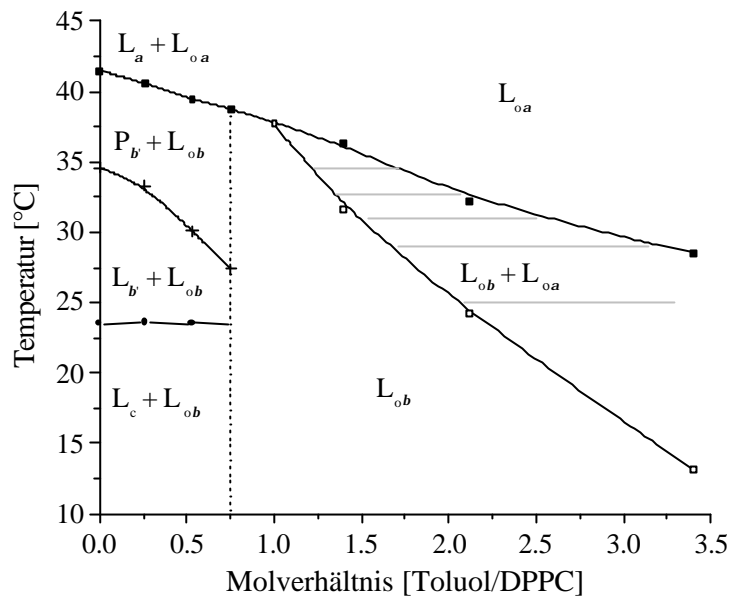


Abbildung 3-11: Ermitteltes Temperatur-Zusammensetzungs-Diagramm aus den kalorimetrischen Meßdaten für das System Toluol/DPPC (Erläuterung im Text). Symbole mit dem Index „o“ bezeichnen eine toluolhaltige DPPC-Phase, Symbole ohne den Index eine reine DPPC-Phase. Die jeweiligen Phasenumwandlungen sind durch verschiedene Symbole charakterisiert: (—●—) repräsentiert die Subgelumwandlung $L_c \rightarrow L_b$, (—+—) die Vorumwandlung $L_b \rightarrow P_b$ und (—■—) die Hauptumwandlung. Letztere setzt sich bei kleinen Toluolkonzentrationen vermutlich aus den Umwandlungen $P_b \rightarrow L_a$ und $L_{ob} \rightarrow L_{oa}$ zusammen, die jedoch nicht getrennt detektiert werden können. Oberhalb von Molverhältnissen von 1.4 existiert vermutlich ein Zweiphasengebiet (schraffierter Bereich) mit Koexistenz einer Gelphase (L_{ob}) sowie einer flüssig-kristallinen Phase (L_{oa}).

Auffällig zeigt sich im Bereich tiefer Temperaturen, daß die Subgel-Umwandlung bis zu einem Molverhältnis Toluol/DPPC von 0.75 ohne Beeinflussung der Übergangstemperatur durch Toluol beobachtet werden konnte. Die Persistenz der L_c -Phase deutet darauf hin, daß in den Vesikeln ausgedehnte Bereiche reinen Lipids vorliegen, deren Größe mit steigender Solubilisatkonzentration fällt [79]. Somit koexistieren im Bereich kleiner Toluolkonzentrationen Gebiete von Toluol und Lipid (Index „o“) neben Gebieten reinen Lipids (kein Index). Diese Bereiche reinen Lipids verschwinden schließlich bei steigender Toluolkonzentration. Auch die Erniedrigung der Temperatur der Vorumwandlung im Bereich kleiner Solubilisatkonzentration deutet auf die Koexistenz einer reinen sowie einer solubilisathaltigen Phase hin. Durch diese Koexistenz innerhalb der Vesikel wird das zur Bildung der P_b -Phase nötige Ausweichen der Doppelschicht in die dritte Dimension vermutlich zunehmend unterdrückt und die Umwandlungstemperatur erniedrigt. Dieser Einfluß kann durch mikroskopische Untersuchungen bestätigt werden (siehe Kapitel 3.3). Die Koexistenz einer reinen L_a -Phase und einer toluolhaltigen L_{oa} -Phase ist nicht eindeutig. Die Empfindlichkeit

des Meßgerätes reicht nicht aus, um eine separate Detektion der Umwandlungen $P_b' \rightarrow L_a$ sowie $L_{ob} \rightarrow L_{oa}$ vorzunehmen, da die Signale vermutlich überlagert sind. Die konstante Kooperativität in Abbildung 3-10 deutet jedoch auf eine Koexistenz im Bereich kleiner Solubilisatkonzentrationen hin.

Ein Überschuß des Solubilisats führt bei einem Molverhältnis oberhalb von 1.4 zum Auftreten eines neuen Signals bei niedriger Temperatur (vgl. Abbildung 3-9). Unter Berücksichtigung dieses Signals kann auf die Existenz eines Zweiphasengebiet (schraffierter Bereich in Abbildung 3-11) mit Koexistenz einer Gelphase (L_{ob}) sowie einer flüssig-kristallinen Phase (L_{oa}) geschlossen werden. Bei Temperaturerhöhung resultiert wiederum eine einzige flüssig-kristalline L_{oa} -Phase. Mikroskopische Untersuchungen deuten auf die Koexistenz einer toluolarmen und einer toluolreichen DPPC-Phase oberhalb Molverhältnissen von 4 innerhalb einzelner Vesikel hin (vgl. Kapitel 3.3).

3.2 Einfluß des Phasenverhaltens auf die Morphologie von Vesikeln

Die Interaktion eines lipophilen Solubilisats mit dem Amphiphil findet innerhalb der Doppelschicht fast ausschließlich im unpolaren Bereich des Phospholipids statt. Folglich ist eine Erhöhung des effektiven Packungsparameters P und eine Änderung der Vesikelgestalt zu erwarten. Eine mögliche Konsequenz, die Bildung vergleichbar großer Vesikel, kann bei aromatischen Solubilisaten, aber insbesondere nach Solubilisierung von Alkanen beobachtet werden. An dieser Stelle stellt sich jedoch die Frage, inwieweit das beschriebene Phasenverhalten und besonders inhomogene Solubilisatkonzentrationen innerhalb eines Vesikels die Gestalt verändern. Aus diesem Grunde wurden mikroskopische Untersuchungen an riesigen Vesikeln unterschiedlicher Toluolkonzentration mit Hilfe der sogenannten Video-Kontrastverstärkungs-Mikroskopie [80] durchgeführt.

3.2.1 Mikroskopische Methoden im Bereich der Kolloidwissenschaften

Mikroskopische Methoden ermöglichen eine Visualisierung von Vesikeln in wässriger Lösung. Eine Technik, die eine nahezu störungsfreie Untersuchung dynamischer Prozesse kolloidaler Strukturen in wässrigem Medium erlaubt, ist die Video-Kontrastverstärkungs-Mikroskopie [81]. Diese wurde von Allen et al. im Jahre 1981 entwickelt und basiert auf dem Prinzip der Lichtmikroskopie. Durch Adaption einer hochauflösenden Schwarzweiß-Videokamera ermöglicht sie eine Echtzeit-Bildbearbeitung zur Darstellung kontrastreicher Bildinformationen in hoher Graustufentiefe [82]. Durch den Einsatz hochaperturiger Linsensysteme kann ferner das Auflösungsvermögen mit einem Wert von etwa dem Viertel der Wellenlänge des verwendeten Lichtes im Vergleich zur herkömmlichen Lichtmikroskopie deutlich verbessert werden [83]. Gleichzeitig können kontrastreiche Abbildungen erzielt werden, so daß eine detaillierte Beobachtung der mikroskopischen Feinstruktur kontrast-schwacher Objekte, wie sie im Bereich amphiphiler Aggregate vorliegen, möglich ist [84].

Die Erkennbarkeitsgrenze wird weiterhin deutlich verbessert, so daß kolloidale Partikel bis zu Durchmessern von etwa 20 nm detektiert und in ihrer Dynamik untersucht werden können [85]. Da die Video-Kontrastverstärkungs-Mikroskopie im Rahmen dieser Arbeit routinemäßig verwendet wurde, soll im folgenden das zugrundeliegende Prinzip kurz erläutert werden.

3.2.2 Video-Kontrastverstärkungs-Mikroskopie

Die Video-Kontrastverstärkungs-Mikroskopie beruht auf der Verwendung eines qualitativ hochwertigen Durchlichtmikroskops mit einem Linsensystem hoher numerischer Apertur (N.A.) und herkömmlichen kontrastverstärkenden Methoden wie dem differentiellen Interferenzkontrast (vgl. Abbildung 3-12) [80,86].

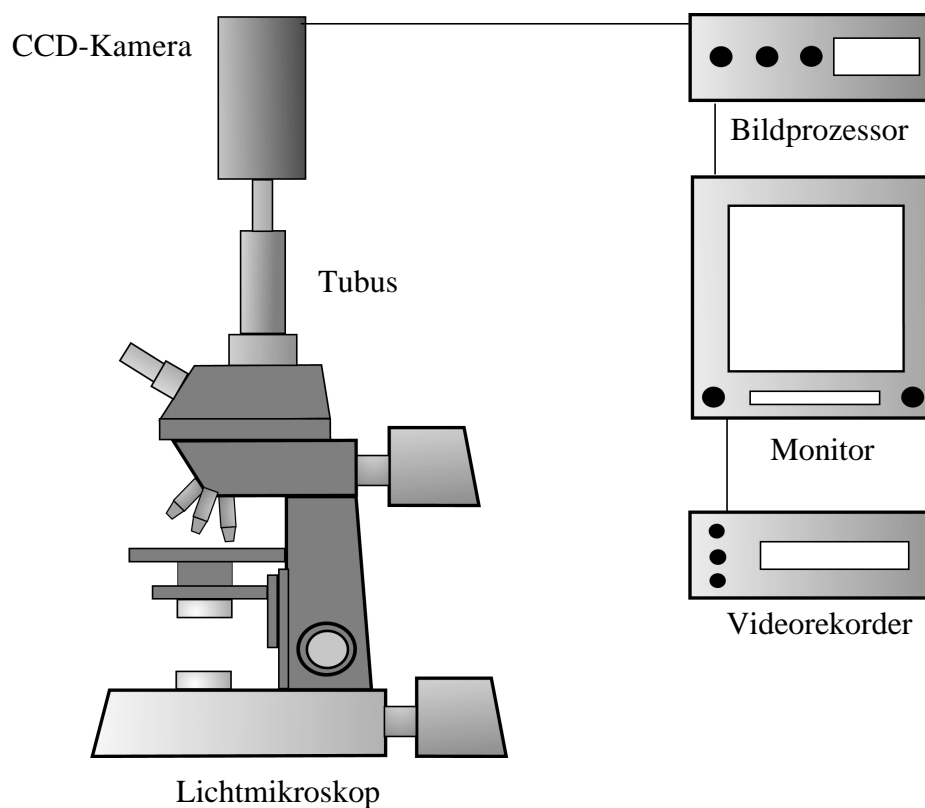


Abbildung 3-12: Schematischer Aufbau des Video-Kontrastverstärkungs-Mikroskops bestehend aus einem Lichtmikroskop mit Auflichtfluoreszenzeinrichtung (Erläuterungen im Text).

Eine schwingungsgedämpfte Installation des Mikroskops verhindert den Einfluß von Erschütterungen. Das vom Objektiv gelieferte Zwischenbild wird durch ein Zoom-Okular in hoher Nachvergrößerung auf einen Bildaufnehmer, einen mit Mikrolinsen versehenen CCD-Chip (charge-coupled device) einer hochauflösenden Schwarzweiß-Videokamera mit „lens-on-chip“-Technologie, projiziert. Hierbei gewährleisten variable Linsensysteme eine optimale Nachvergrößerung und die Vermeidung leerer Vergrößerungen, so daß letztendlich die

Qualität des verwendeten optischen Systems die erzielbare Auflösung bestimmt. Mit Hilfe eines Bildprozessors erfolgt eine analoge sowie digitale Aufarbeitung der Bildinformation der CCD-Kamera in Echtzeit, wobei die Bildfolgen kontrastreich in hoher Auflösung an einem Monitor ausgegeben oder aufgezeichnet und nachträglich analysiert werden können. Grundvoraussetzung für diese Methode ist eine möglichst hohe Lichtausbeute. Diese wird durch Verwendung von Linsensystemen mit hoher numerischer Apertur sowohl seitens des Kondensors, als auch der Objektive gewährleistet. Hierdurch kann ein günstiges Signal/Rauschverhältnis erzielt werden. Das Bild weist jedoch auch einen hohen Streulichtanteil auf, so daß die betrachteten Strukturdetails vom menschlichen Auge nicht mehr erkannt werden können. Aus diesem Grunde werden zunächst die Helligkeitsunterschiede durch Modulation der Spannungskomponente des Kamerasignals verstärkt und im folgenden die Hintergrundhelligkeit durch eine zugeschaltete Gleichspannung kompensiert. Das primär gelieferte Bild weist jedoch neben den gut aufgelösten Strukturen aufgrund der hohen Kontrastanhebung zudem einen stark „verschmutzten“ Hintergrund auf, da auch feinste Staubkörner auf den Linsen, Linsenabbildungsfehler und geringste Beleuchtungsunebenheiten stärker in Erscheinung treten. Da das Hintergrundmuster bei Defokussierung erhalten bleibt, kann dieses mit Hilfe des Bildprozessors digital gespeichert und in Videofrequenzen vom jeweiligen Gesamtbild subtrahiert und dadurch das mikroskopische Videobild „gereinigt“ werden. Das zunächst kontrastarme Bild wird im folgenden durch lineare Filter verstärkt und somit einzelne Strukturdetails der Objekte hervorgehoben.

3.3 Mikroskopische Untersuchung des thermotropen Polymorphismus

Abbildung 3-13 zeigt den Einfluß der Einlagerung von Toluol auf die Vesikelgestalten unilamellarer Vesikel.

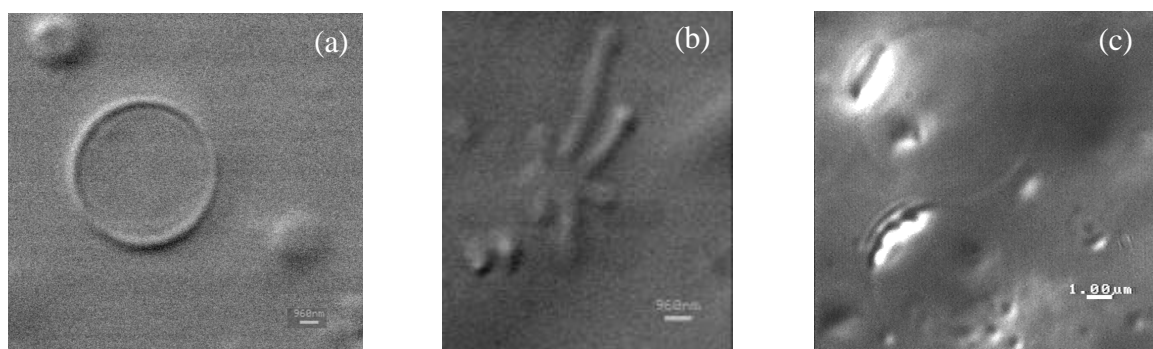


Abbildung 3-13: Vesikelformen riesiger DPPC-Vesikel ($c = 1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) in Abhängigkeit von der Toluolkonzentration bei einer Temperatur von $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$. Die Bilder entsprechen steigenden Molverhältnissen (Toluol/DPPC): (a) sphärisches Vesikel bei äquimolaren Verhältnissen, (b) seesternförmiges Vesikel bei einem Molverhältnis von 3, (c) sphärisches Vesikel mit phasensepariertem Toluol im Membranbereich (heller Bildbereich) oberhalb eines Molverhältnisses von 7.

Die mikroskopischen Untersuchungen unter isothermen Bedingung deuten auf die Existenz unterschiedlicher Konzentrationsbereiche hin, in denen verschiedene Vesikelgestalten dominant sind. Kleine Solubilisatkonzentrationen beeinflussen die Membranstruktur und unterdrücken die polygonalen Strukturen der Gelphase. Im Bereich dieser geringen Toluolkonzentration liegen die Vesikel überwiegend in sphärischer Gestalt vor. Mit zunehmender Solubilisatkonzentration treten myelinartige, nicht-sphärische Formen geringer Symmetrie unter Erhalt der Doppelschichtstruktur auf. Insbesondere im beschriebenen Zweiphasengebiet der Koexistenz der Gelphase (L_{ob}) sowie der flüssig-kristallinen Phase (L_{oa}) zeigen sich Strukturen wie die in Abbildung 3-13 (b) dargestellte Seesternform mit partiell fluiden Membranbereichen.

Die Erhöhung der Molverhältnisse Toluol/DPPC führt zur Bildung vesikulärer Strukturen mit durchweg fluidem Charakter. Diese weisen oftmals Bereiche unterschiedlicher Membrankrümmung auf (vgl. Abbildung 3-14).

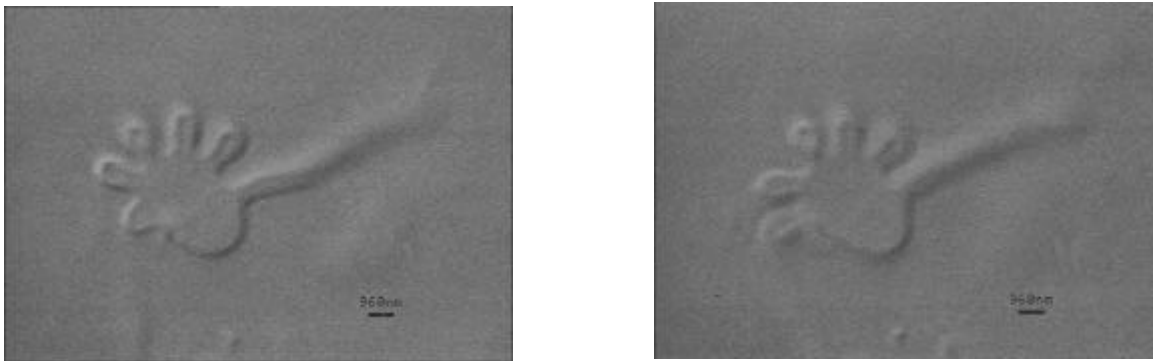


Abbildung 3-14: Unilamellares Dipalmitoylphosphatidylcholin-Vesikel nach Solubilisierung von Toluol bei einer Temperatur von $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$. Das Molverhältnis beträgt etwa 5. Die Struktur zeigt die Charakteristika einer flüssig-kristallinen Phase (L_{oa}), weist jedoch Bereiche sehr unterschiedlicher Krümmung auf, in denen differierende Solubilisatkonzentrationen zu erwarten sind.

Da jedoch die Membrankrümmung und die lokale Konzentration des Solubilisats gekoppelt sind, ist dies ein deutlicher Hinweis auf die mögliche Koexistenz fluider solubilsatreicher neben solubilsatarmer Regionen innerhalb einzelner Vesikel (im Diagramm in Abbildung 3-11 nicht implementiert). Da die Doppelschicht bei steigender Solubilisatmenge relativ leicht in die dritte Dimension deformiert werden kann, sollten ebenfalls unterschiedliche vertikale Membrandimensionen zu erwarten sein.

Oberhalb des maximalen Solubilisierungsvermögens der Vesikel, erkennbar an der Koexistenz einer O/W-Emulsion, zeigt sich weiterhin eine visualisierbare Koexistenz der ölreichen Region innerhalb der Vesikel. Das phasenseparierte Solubilisat ist mit Hilfe mikroskopischer Techniken im Membranbereich nachweisbar (Abbildung 3-13 (c)). Detaillierte Untersuchungen bestätigten die Bildung dieser Überschußphase aufgrund einer lateralen

Phasentrennung von Solubilisat und Amphiphil [47]. Die Phasenseparation ist im allgemeinen verknüpft mit einer deutlichen Änderung der Vesikelmorphologie (vgl. Abbildung 3-15).

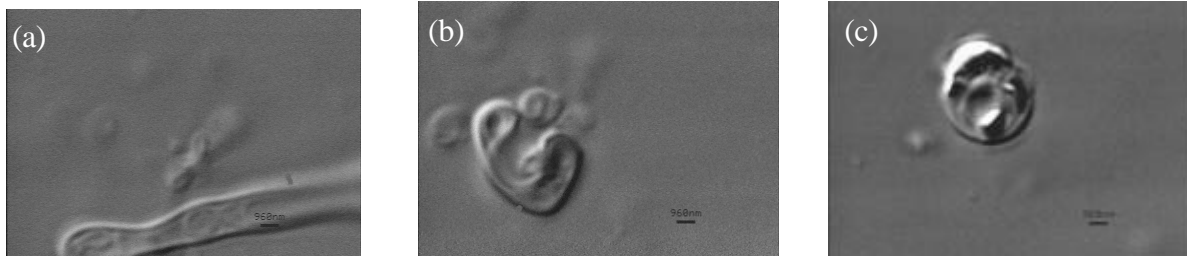


Abbildung 3-15: Prozeß der lateralen Phasentrennung einer toluolbeladenen vesikulären Struktur von DPPC [47]. Aufgrund von Temperaturschwankungen erfolgt die Umwandlung der tubusförmigen Gestalt (a) in eine sphärische Vesikelgestalt (c) unter Bildung einer Überschußphase von Toluol (helle Bereiche) in der Membran.

Das Auftreten unterschiedlicher Membrankrümmung nach Solubilisierung und die somit verbundene mögliche Koexistenz fluider solubilisatreicher neben solubilisatarmen Regionen kann ebenfalls im System DMPC/Toluol beobachtet werden (Abbildung 3-16). Weiterhin zeigt sich die Existenz von Überschußphasen für den Bereich der BTX-Aromaten als Solubilisat, wobei die Kettenlänge des verwendeten Lecithins ebenfalls keinerlei Einfluß zeigt.

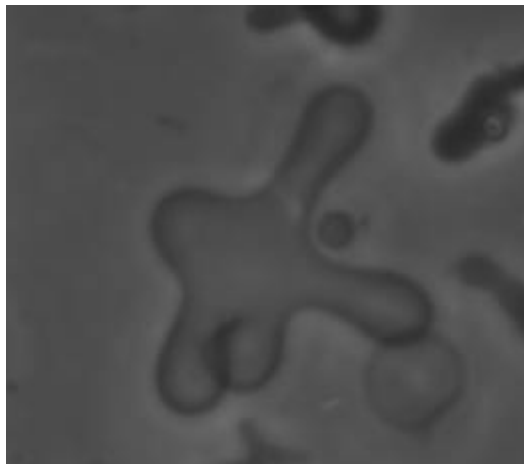


Abbildung 3-16: Phasenkontrastmikroskopische Aufnahme eines „seesternförmigen“ DMPC-Vesikel nach Solubilisierung von Toluol im lipophilen Membranbereich bei $T = 30^{\circ}\text{C}$.

3.4 Zusammenfassung

Kalorimetrische Untersuchungen bestätigen die Solubilisierung unpolarer aromatischer Moleküle im lipophilen Bereich der Doppelschicht von Phospholipidvesikeln. Der Einbau der Solubilisate beeinflusst hierbei das thermotrope Phasenverhalten der Amphiphile signifikant, wobei eine deutliche Abhängigkeit von der Struktur des Solubilisats und der hieraus resultierenden Affinität zur Kopfgruppe zu beobachten ist. Die untersuchten lipophilen Solubilisate erniedrigen die Temperatur T_m wie auch die Umwandlungsenthalpie ΔH der Hauptumwandlung deutlich und vermindern deren Kooperativität.

Eine detaillierte Untersuchung des Phasenverhaltens des Systems DPPC/Toluol zeigt, daß die Einlagerung der lipophilen Moleküle innerhalb der Vesikel nicht über den gesamten beobachteten Konzentrationsbereich homogen erfolgt. Vielmehr koexistieren vermutlich im Bereich kleiner Solubilisatkonzentrationen Phasen reines Phospholipids mit ölhaltigen Phasen. Oberhalb äquimolarer Konzentrationen des Solubilisats zeigt sich desweiteren eine Koexistenz einer Gel- mit einer fluiden Phase, sowie im Bereich hoher Toluolkonzentrationen eine Koexistenz der fluiden toluolhaltigen Phase mit einer Überschußphase des Öls. Diese entmischen zu mikroskopisch sichtbaren Toluoldomänen innerhalb der Doppelschicht. Hierdurch bedingt ergeben sich relativ große Solubilisierungskapazitäten für aromatische Solubilisate. Mikroskopische Beobachtungen bestätigen die analysierten thermotropen Eigenschaften nach Solubilisierung von Toluol. Ferner bekräftigen sie die Möglichkeit der Koexistenz unterschiedlicher Phasen innerhalb einzelner Vesikel.

4 Mechanochemische Eigenschaften von Phospholipidvesikeln

Im vorangegangenen Kapitel erfolgte eine eingehende Untersuchung der Interaktion von Amphiphil und lipophilem Solubilisat auf molekularer Ebene sowie eine Charakterisierung des Einflusses auf die intrinsischen Eigenschaften der Doppelschicht. An dieser Stelle bleibt jedoch die Frage zu beantworten, inwiefern ein lipophiles Solubilisat die mechanische Beschaffenheit der Doppelschicht und insbesondere die elastischen Membraneigenschaften beeinflusst. Hierzu wird im folgenden Kapitel eine im Rahmen dieser Arbeit modifizierte Methode zur Bestimmung elastischer Konstanten vorgestellt und zunächst eingehend geprüft. Im Anschluß erfolgt eine detaillierte Analyse des Einflusses lipophiler Solubilisate auf die Biegesteifigkeit von Phospholipidvesikeln und eine Korrelation der Ergebnisse mit den Beobachtungen auf molekularer Ebene.

4.1 Elastische Eigenschaften amphiphiler Substanzen

Die elastischen Eigenschaften dominieren das dynamische Verhalten sowohl bei Krümmungsänderungen, als auch beim Strecken von Mono- bzw. Doppelschichten und die thermodynamischen Eigenschaften von Amphiphilfilmen an Grenzflächen. Der Krümmungselastizität kommt ferner bei der thermodynamischen Betrachtung von Mikroemulsionen und lamellaren Phasen eine zentrale Rolle zu. Viele charakteristische Phänomene im Bereich biologischer Membranen, wie das wohlbekannte „Flickering“ der Erythrocyten, beruhen auf dem elastischen Verhalten [87].

4.2 Elastizität von Vesikeln

Das Verhalten und die Gestalt fluider Vesikel wird wesentlich durch die elastischen Eigenschaften der Membranen geprägt. Diese sind durch ein hochelastisches Verhalten und eine geringe Biegesteifigkeit k_c in Größenordnungen von $k_c = 10 - 40 \, kT$ gekennzeichnet. Vesikel nehmen diejenige Gestalt an, bei der die Krümmungsenergie minimal ist. Basierend auf dieser Grundlage wird es möglich, Vesikelgestalten aber auch Gestaltänderung theoretisch zu beschreiben und auf Beobachtungen in biologischen Systemen wie die Gestalt der Erythrocyten oder zellulären Vorgängen wie der Endo- und Exocytose zu projizieren. Die Kenntnis der Biegesteifigkeit ist weiterhin von essentieller Bedeutung für die Charakterisierung des Verhaltens von Vesikeln in Kapillaren.

Die Vesikelmembran zeigt in der fluiden Phase bei schwacher mechanischer Belastung drei wesentliche elastische Eigenschaften.

4.2.1 Scherelastizität

Die Scherelastizität kann für Doppelschichten in der fluiden Phase aufgrund der hohen lateralen Beweglichkeit der Lipidmoleküle als ineffektiv betrachtet werden [88]. Sie wird folglich bei weiteren Betrachtungen vernachlässigt. Die Scherelastizität spielt jedoch eine entscheidende Rolle, falls eine zusätzliche Vernetzung der Amphiphilmoleküle untereinander vorliegt. Sie hat weiterhin Bedeutung im Bereich biologischer Membranen. Hier liegt wie im Falle der Erythrocyten ein zellspezifisches Zytoskelett vor, ein in der Membran verankertes Polymergeflecht, welches die elastischen Membraneigenschaften maßgeblich beeinflusst.

4.2.2 Dehnungselastizität

Eine Deformation in Form eines tangentialen Drucks oder einer Spannung tritt in Erscheinung, sobald die Membranfläche in Form einer Dehnung oder Stauchung verändert wird. Falls die Zeitspanne dieser Systemstörung kleiner ist als die Zeit, die das System benötigt, um Moleküle aus einem Reservoir, z.B. der Bulkphase, auszutauschen, so entspricht diese Störung einer elastischen Deformation. Die Molekülanzahl in der Membran von Phospholipidvesikeln ist aufgrund der geringen Löslichkeit der Amphiphile festgelegt. Die Dehnungsenergie E_s pro Fläche A einer elastischen Deformation ist somit gegeben durch

$$E_s = \frac{1}{2} k_s \left(\frac{\Delta A}{A} \right)^2 \quad (4.1)$$

wobei $\Delta A = A - A_0$.

Typische Werte für den Dehnungsmodul k_s liegen im Bereich von 100 - 300 mN · m⁻¹ [89]. Somit benötigt jede Form der lateralen Deformation eine verhältnismäßig große Energiemenge entsprechend dem Vierfachen der Grenzflächenspannung einer Öl/Wasser-Grenzfläche [20]. Eine Ausdehnung der Membranfläche, wie sie beispielsweise mit der Mikropipettentechnik erzeugt werden kann, ist um etwa 5 % möglich; eine weitere Ausdehnung führt zur Bildung lipophiler Poren bzw. zum Bruch der Vesikel [90].

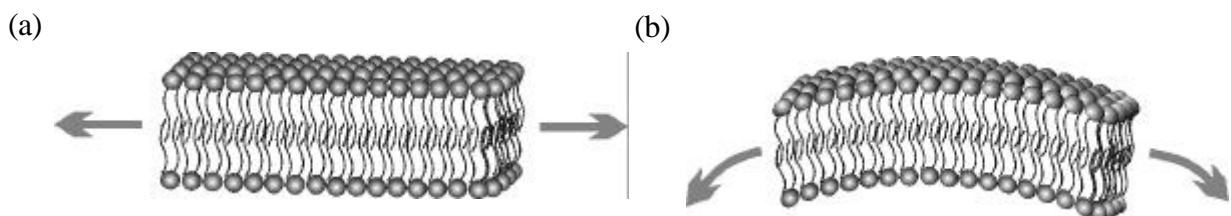


Abbildung 4-1: Schematische Darstellung der Dehnung (a) und Krümmung (b) einer Phospholipiddoppelschicht.

4.2.3 Krümmungselastizität

Die fluiden Membranen der Phospholipidvesikel sind durch eine hohe Flexibilität gekennzeichnet und als hochelastisch zu betrachten. Vesikel sind aus diesem Grunde in der Lage, thermisch angeregt um ihren Gleichgewichtslage zu fluktuieren, d.h. zu undulieren. Diese Auslenkungen vom Energieminimum erfolgt unter Erhöhung der Konformations-Entropie und ist eine Folge der zweidimensionalen Brown'schen Molekularbewegung. Typische Werte für den Modul der Biegesteifigkeit k_c von Phospholipidvesikeln liegen im Bereich von $k_c = (1 - 2) \cdot 10^{-19}$ J [91,92,93]. Die zum Biegen der Membran aufzuwendende Energie liegt weit unterhalb der zur Dehnung nötigen. Bei Einwirkung kleiner Kräfte auf die Vesikelmembran dominiert infolgedessen die Krümmungselastizität der Membran, so daß der Fokus der Untersuchungen auf die Charakterisierung des Biegesteifigkeitsmoduls k_c gelegt wird.

4.3 Bestimmung der Biegesteifigkeit

Der vertikale Durchmesser der Phospholipiddoppelschicht ist mit etwa 4 nm im Vergleich zur lateralen Ausdehnung von einigen 10 µm vernachlässigbar klein. Die fluide Membran kann somit mathematisch als eine zweidimensionale elastische Fläche in einem dreidimensionalen Raum betrachtet werden. Die elastische Energie dieser Fläche wird im wesentlichen durch die Krümmungsenergie E_c bestimmt. Der mathematischen Betrachtung zur Ermittlung der Biegesteifigkeit aus den Fluktuationen um die Gleichgewichtslage liegen hierbei folgende Voraussetzungen zugrunde:

Die Membranfläche A ist eine für jedes Vesikel konstante Größe, da wie beschrieben der Austausch von Molekülen mit der Wasserphase aufgrund der geringen Löslichkeit der Lipide vernachlässigt werden kann. Gleichzeitig wird das Volumen V des Vesikels als konstant angesehen, da die Diffusion von Wasser durch den lipophilen Membranbereich ein für den Beobachtungszeitraum langsamer Prozeß ist. Desweiteren ist die Flächendifferenz $\Delta A_{\text{Membran}}$ der inneren und äußeren Monoschicht nach $\Delta A_{\text{Membran}} = A_a - A_i$ als konstant zu betrachten, da ein Molekülaustausch zwischen den Monoschichten in Form eines „Flip-Flop“-Prozesses eine hohe Aktivierungsenergie erfordert.

Die Änderung der Krümmung der Membran in eine Richtung wird durch das Auftreten eines Krümmungsmomentes ermöglicht, wobei eine Monoschicht gedehnt und die andere gestaucht wird. Zur Ermittlung des Beitrags der Krümmung an der freien Energie betrachtet man ein lokales Koordinatensystem mit der z-Achse parallel zur Flächennormalen. Die Abszisse und die Ordinate liegen in Richtung der Hauptkrümmungen c_x und c_y . Die Deformation der Membran wird nunmehr beschrieben durch die Verschiebung u der Doppelschicht in der Normalenrichtung.

Es gilt

$$c_x = \frac{\partial^2 u}{\partial x^2} \text{ sowie } c_y = \frac{\partial^2 u}{\partial y^2}.$$

Bei der Entwicklung in zweiter Ordnung tragen nur die Terme zur Krümmungsenergie bei, die von der Orientierung des Koordinatensystems unabhängig sind. Die von Helfrich beschriebene Kontinuums-Theorie der Elastizität flüssiger Membranen liefert für die elastische Energie pro Flächeneinheit für kleine Deformationen den Ausdruck [88]

$$E_c = \frac{1}{2} k_c \left(\frac{\partial^2 u}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 u}{\partial y^2} - c_0 \right)^2 + \bar{k}_c \left(\frac{\partial^2 u}{\partial x^2} \cdot \frac{\partial^2 u}{\partial y^2} - \frac{\partial}{\partial y} \left(\frac{\partial u}{\partial x} \right) \cdot \frac{\partial}{\partial x} \left(\frac{\partial u}{\partial y} \right) \right)$$

$$E_c = \frac{1}{2} \cdot k_c (c_1 + c_2 - c_0)^2 + \bar{k}_c \cdot c_1 \cdot c_2. \quad (4.2)$$

k_c bezeichnet den Modul der Biegesteifigkeit und $c_1 = r_1^{-1}$, $c_2 = r_2^{-1}$ die beiden Hauptkrümmungen. Der lineare Term c_0 kennzeichnet die spontane Krümmung, einen Parameter, der eine lokale Vorkrümmung der Fläche, d.h. einen möglichen nicht-flachen, relaxierten Zustand der Membran, beschreibt. Dieses ist zu berücksichtigen, falls auf beiden Membranseiten verschiedene wäßrige Lösungen angrenzen, oder die beiden Monoschichten unterschiedliche Moleküle aufweisen. Die Membran besitzt in diesen Fällen schon eine bevorzugte Krümmung, die in der freien Energie als Nullpunktverschiebung für die Krümmung durch c_0 einbezogen wird.

Während die elastische Konstante k_c die zylindrische Krümmung beschreibt und sich auf Änderungen in der mittleren Krümmung H

$$H = \frac{c_1 + c_2}{2} \quad (4.3)$$

bezieht, charakterisiert der Modul der Gauß'schen Krümmung \bar{k}_c eine sattelförmige, gemäß

$$K = c_1 \cdot c_2. \quad (4.4)$$

Hierbei hängt der Modul der Gauß'schen Krümmung für eine homogene, isotrope Fläche von deren Topologie ab. Für eine geschlossene Kugelschale, wie die im folgenden betrachteten quasi-sphärischen Vesikel, liefert die Integration über die gesamte Fläche nach dem Gauß-Bonnet-Theorem [94] einen konstanten Betrag von $4\pi\bar{k}_c$. Die Vesikelgestalt ist somit unabhängig von \bar{k}_c .

Für die freie Energie E_c eines sphärischen Vesikels mit $c_1 = c_2$ gilt folglich unter Vernachlässigung einer spontanen Krümmung ($c_0 = 0$)

$$E_c = \frac{k_c}{2} \cdot \int_A dA (c_1 + c_2)^2 = 8\pi k_c. \quad (4.5)$$

4.4 Methoden zur Bestimmung der Biegesteifigkeit

Zur Bestimmung der elastischen Eigenschaften von Vesikeln existieren eine Reihe verschiedener Techniken. Diese können in unterschiedliche Kategorien eingeteilt werden.

Die erste Kategorie bezeichnet invasive Methoden wie die Mikropipetten-Einsaugtechnik. Diese beruhen, wie auch die Technik der Deformation quasi-sphärischer Vesikel im elektrischen Feld [93,95], auf der Untersuchung der Reaktion der Membran auf eine angelegte Kraft [96,97]. In die zweite Kategorie fallen nicht-invasive Methoden wie beispielsweise die Synchrotron-Röntgenstreuungstechnik [98]. Die im Rahmen dieser Arbeit verwendete lichtmikroskopische Methode der Fluktuationsanalyse fällt ebenfalls in diese Kategorie. Sie beruht auf der Ermittlung der Biegesteifigkeit aus den mittleren quadratischen Amplituden thermisch angeregter Fluktuationen quasi-sphärischer [99,100] oder tubusförmiger Vesikel [101].

4.4.1 Prinzip der Fluktuationsanalyse

Die Fluktuationsanalyse einzelner frei fluktuierender, quasi-sphärischer Vesikel ist eine Methode der Lichtmikroskopie zur berührungsfreien Bestimmung des Biegesteifigkeitsmoduls k_c . Sie beruht auf der Arbeit von Schneider et al. im Jahre 1984 [99] und wurde durch Milner und Safran [102] weiterentwickelt. Das zugrundeliegende Modell basiert auf der Entwicklung der Abweichung der Vesikelmembran von der sphärischen Gestalt in zweiter Ordnung. Entsprechend können die Auslenkungen mit Hilfe dreidimensionaler Kugelfunktionen beschrieben und die Amplituden der Kugelfunktionen als Funktion der Biegesteifigkeit k_c sowie der effektiven Spannung $\bar{\sigma}$ ausgedrückt werden. Da die mikroskopischen Untersuchungen zunächst nur Informationen über die Fluktuationsamplituden der zweidimensionalen Kontur liefern, erfolgt die Korrelation mit der dreidimensionalen Theorie unter Verwendung eines Projektionsalgorithmus.

4.4.2 Theoretische Grundlagen

Ein Vesikel kann wie beschrieben als eine quasi-sphärische Hülle mit einem konstanten Volumen V und einer konstanten Fläche A betrachtet werden. Besitzt das Vesikel verglichen mit einer Kugel gleichen Volumens einen Flächenüberschuß Δ , so kann ein äquivalenter Radius r_0 einer entsprechenden Kugel gleichen Volumens V definiert werden. Es gilt

$$V = \frac{4\pi}{3} r_0^3 . \quad (4.6)$$

Mit Definition des dimensionslosen Flächenüberschusses Δ , der die für die Fluktuationen zur Verfügung stehende Fläche kennzeichnet, folgt ferner

$$A = 4\pi r_0^2 (1 + \Delta), \quad (4.7)$$

wobei $\Delta \geq 0$ ist.

Die Brown'sche Molekularbewegung bedingt eine thermische Anregung quasi-sphärischer Vesikel und bewirkt eine permanente Oszillation der Vesikelgestalt um die Gleichgewichtsform. Die Deformationen um eine sphärische mittlere Form können folglich durch eine Reihenentwicklung bis zur zweiten Ordnung zu einem Zeitpunkt t gemäß

$$r(\mathbf{J}, \mathbf{j}, t) = r_0 (1 + u(\mathbf{J}, \mathbf{j}, t)) \quad (4.8)$$

definiert werden. Hierbei kennzeichnen $u(\mathbf{J}, \mathbf{j}, t)$ die relativen Deformationen eines geringfügig deformierten Vesikels mit

$$|u(\mathbf{J}, \mathbf{j}, t)| \ll 1, \text{ sowie } \Delta \ll 1,$$

wobei der Ursprung im Vesikelzentrum liegt. Der Radius $r(\mathbf{J}, \mathbf{j}, t)$ wird in Polarkoordinaten mit dem Polarwinkel \mathbf{J} und dem Azimutwinkel \mathbf{j} ausgedrückt.

Der dynamische Teil der Deformationen, d.h. die thermischen Fluktuationen können somit in Termen der Kugelfunktionen $Y_l^m(\mathbf{J}, \mathbf{j})$ mit den zeitabhängigen Amplituden $a_l^m(t)$ beschrieben werden. Mit

$$u(\mathbf{J}, \mathbf{j}, t) = \sum_{l,m}^{l_{\max}} a_l^m(t) Y_l^m(\mathbf{J}, \mathbf{j}) \quad (4.9)$$

folgt aus (4.8)

$$r(\mathbf{J}, \mathbf{j}, t) = r_0 \left(1 + \sum_{l,m}^{l_{\max}} a_l^m(t) Y_l^m(\mathbf{J}, \mathbf{j}) \right) \quad (4.10)$$

mit $l \geq 2$ und $|m| \leq l$.

Die Summation über alle l beginnt bei $l = 2$, da, falls die Moden mit $l = 0$ von Null verschieden sind, die Restriktion der Volumenkonstanz nicht eingehalten wird. Moden mit $l = 1$ hingegen entsprechen einer Translation der Sphäre. Sind diese von Null verschieden, so stimmt das ermittelte Massenzentrum nicht mehr mit dem des wahren Volumens V überein. Die Wellenzahl l_{\max} repräsentiert die Grenze der Summation, entsprechend der Mode mit der kleinsten möglichen Wellenlänge. Diese liegt im Bereich der Dicke der Doppelschicht.

Die Kugelfunktionen $Y_l^m(\mathbf{J}, \mathbf{j})$ werden durch die Legendre Polynome $P_l^m(\cos \mathbf{j})$ nach

$$Y_l^m(\mathbf{J}, \mathbf{j}) = (-1)^m \sqrt{\frac{2l+1}{4\pi} \frac{(l-m)!}{(l+m)!}} \cdot P_l^m(\cos \mathbf{j}) \cdot e^{im\mathbf{j}} \quad (4.11)$$

mit dem angularen Moment l und der Quantenzahl m definiert [103].

Befindet sich ein Vesikel in einem thermischen Reservoir und ist der Druck im Inneren des Vesikels gleich dem äußeren, so kann mit (4.10) der zeitliche Erwartungswert der Fluktuationsamplituden mit der Temperatur in Beziehung gesetzt werden. Die einzelnen Schwingungsmoden sind nach der hydrodynamischen Theorie der Modenrelaxation nicht gekoppelt [104]. Aus diesem Grunde lassen sich die Amplituden jeder Kugelfunktion berechnen. Als kanonische Variable der Energie gehen die Amplituden quadratisch in die Energie ein und liefern gemäß dem Gleichverteilungssatz einen Betrag von $\frac{1}{2} kT$. Die normalisierten mittleren quadratischen Amplituden der Kugelfunktionen sind mit $c_0 = 0$ gemäß [102]

$$\langle |a_l^m|^2 \rangle = \frac{kT}{k_c (l+2) (l-1) [l(l+1) + \bar{s}]} \quad (4.12)$$

charakterisiert. Durch Einführung des dimensionslosen Lagrangeparameters \bar{s} , einer effektiven (*reduzierten*) Grenzflächenspannung, wird hierbei die Zwangsbedingung der konstanten Membranfläche berücksichtigt. Aus (4.12) wird ersichtlich, daß die Berechnung des Erwartungswerts des Amplitudenquadrats als Scharmittel durch die Bestimmung einzelner Zustände der Fluktuation in beliebiger Zeitabfolge nach Zerlegung in die jeweiligen Kugelfunktionen möglich ist.

$$\langle |a_l^m|^2 \rangle = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^{i=N} |a_l^m|^2 \quad (4.13)$$

Der Ausdruck $\langle \rangle$ kennzeichnet hierbei den zeitlichen Mittelwert. Die freie Energie eines quasi-sphärischen fluktuierenden Vesikels folgt unter Vernachlässigung der spontanen Krümmung sowie der effektiven Spannung der Beziehung

$$E_c = 8\pi k_c + \frac{k_c}{2} \sum_{l,m} (l+2) \cdot (l-1) \cdot l(l+1) \cdot |a_l^m(t)|^2 \quad (4.14)$$

für Wellenzahlen $l \geq 2$. Die Energie E_c ist somit $(2l+1)$ -fach in m entartet [§].

4.4.2.1 Bedeutung der effektiven Grenzflächenspannung

Die effektive, dimensionslose Grenzflächenspannung \bar{s} , die in (4.12) auftaucht, kann physikalisch als Spannungsterm gemäß einer reduzierten Membranspannung

$$\bar{s} = \frac{\mathbf{s} \cdot \mathbf{r}_0^2}{k_c} \quad (4.15)$$

mit der lateralen Spannung σ definiert werden und resultiert aus der Entropie der Flickerbewegung. Während der Biegesteifigkeitsmodul k_c eine Konstante des Lipids darstellt, entspricht die effektive Spannung vielmehr einer geometrischen Eigenschaft des Vesikels. Diese wird im wesentlichen durch das Verhältnis von Membranfläche zu Vesikelvolumen zum Zeitpunkt der Vesikelbildung bestimmt und verdeutlicht die Individualität des einzelnen

[§] Die Wellenzahlen $l = 0$ und $l = 1$ entsprechen einer Änderung der Größe der Sphäre, bzw. einer Translation und tragen nicht zur Krümmungsenergie bei.

Vesikels. Experimentell können durchaus Vesikel beobachtet werden, die negative Werte der effektiven Spannung \bar{s} aufweisen. Die Grenze des beschriebenen Modells liegt gemäß Gleichung (4.12) bei $\bar{s} \leq -6$. In diesem Bereich nehmen die Vesikel ellipsoidale Gestalt an und die Beschreibung über die Kugelfunktionen verliert die Gültigkeit.

Die Überschußfläche Δ ist gegenüber der effektiven Spannung \bar{s} , dem beschriebenen Lagrangeparameter, eine physikalisch anschauliche Größe. Δ beschreibt den normierten Flächenüberschuß im Vergleich zu einer Kugel gleichen Volumens mit der Fläche A_0 gemäß

$$\Delta = \frac{A - A_0}{A_0} \quad (4.16)$$

Die Überschußfläche ist mit der effektiven Spannung verknüpft durch [105]

$$\Delta = \frac{kT}{8pk_c} \sum_{l \geq 2}^{l_{\max}} \frac{2l+1}{l \cdot (l+1) + \bar{s}}. \quad (4.17)$$

4.4.3 Korrelation der experimentellen Daten mit der Theorie

Die Verwendung der Videomikroskopie erlaubt die Beobachtung thermisch angeregter Formfluktuationen von Vesikeln. Mit Hilfe der digitalen Bildverarbeitung ist die Detektion der Vesikelkontur zu verschiedenen Zeitpunkten t und eine nachfolgende Analyse der Konturdaten möglich.

Das vorgestellte Modell dient zur Beschreibung der Fluktuationen um die sphärische Gestalt und ist für die Untersuchung riesiger nahezu sphärischer Vesikel mit Durchmessern von 5 - 30 μm geeignet, die eine geringe Überschußfläche Δ aufweisen. Diese gelten im folgenden als quasi-sphärisch, d.h. im Mittel rund und weisen keinerlei Vorzugsrichtung auf. Das entsprechende mikroskopische Bild liefert für den Bereich maximalen Kontrastes idealerweise Informationen über die Formfluktuationen in der Äquatorialebene des Vesikels. Hierbei dient der Vesikelschwerpunkt als Bezugsgröße. Bei genügend langer Beobachtungszeit werden alle räumlichen Fluktuationen in der Beobachtungsebene wiedergegeben. Die eigentliche Beobachtungszeit sollte hierbei groß im Vergleich zur Relaxationszeit der Moden sein, wobei Beobachtungszeiten von 3 - 5 Minuten in der Regel ausreichen.

Die Untersuchung mittels der Mikroskopie liefert jedoch ausschließlich Informationen über die Formfluktuationen in der äquatorialen Ebene des Vesikels. Diese müssen mit der dreidimensionalen Theorie verknüpft werden. Hierzu existieren zwei unterschiedliche Ansätze, auf die im folgenden näher eingegangen werden soll.

4.4.4 Fourieranalyse der Konturfluktuationen

Die erstmals von Engelhardt et al. [106] vorgestellte Methode beruht auf der Fourieranalyse der beobachteten Kontur, wobei die Amplituden der verschiedenen Moden zur Bestimmung der Biegesteifigkeit als eine komplexe Summe der Kugelfunktionen ausgedrückt werden.

Die relativen Deformationen $u(\mathbf{j}, t)$ der Konturfluktuation als Abweichung der Vesikeloberfläche von derjenigen einer Sphäre können in der xy -Ebene ($\mathbf{J} = \mathbf{p}/2$) nach Fouriertransformation als zeitabhängige Amplituden $\mathbf{n}_q(t)$ ausgedrückt werden durch

$$\mathbf{n}_q(t) = \frac{1}{2\mathbf{p}} \int_0^{2\mathbf{p}} u(\mathbf{j}, t) e^{i\mathbf{q}\mathbf{j}} d\mathbf{j} . \quad (4.18)$$

Mit (4.9) folgt für die zeitabhängigen Amplituden in der Ebene

$$\mathbf{n}_q(t) = \frac{1}{2\mathbf{p}} \sum_{l=q}^{l=\max} \sum_{m=-l}^{m=l} a_{l,m}(t) \int_0^{2\mathbf{p}} Y_l^m\left(\frac{\mathbf{p}}{2}\mathbf{j}\right) e^{i\mathbf{q}\mathbf{j}} d\mathbf{j} , \quad (4.19)$$

sowie für die Amplitudenquadrate

$$\left\langle |\mathbf{n}_q(t)|^2 \right\rangle = \sum_{l=q}^{l=\max} \left\langle |a_l^m(t)|^2 \right\rangle \left[P_l^q(\cos \mathbf{p}/2) \right]^2 \cdot \frac{2l+1}{4\mathbf{p}} \cdot \frac{(l-q)!}{(l+q)!} . \quad (4.20)$$

Hierbei sind $\left[P_l^q(\cos \mathbf{p}/2) \right]^2$ die Werte der assoziierten Legendre-Polynome in der äquatorialen Ebene.

Die Summation beginnt bei $l = q$, mit $l_{\min} \geq 2$, da sonst der Nenner divergiert. Die Summe ist also eine Funktion der dimensionslosen Wellenzahl der Kontur. Die mittleren quadratischen Amplituden der Konturfluktuationen in der Ebene stehen direkt mit denen der Kugelfunktionen entsprechend Gleichung (4.12) in Verbindung, so daß der Biegesteifigkeitsmodul k_c nach

$$k_c = \frac{kT}{\left\langle |\mathbf{n}_q|^2 \right\rangle} \sum_{l=q}^{l=\max} \frac{2l+1}{4\mathbf{p}} \cdot \frac{(l-q)!}{(l+q)!} \cdot \frac{\left[P_l^q(\cos \mathbf{p}/2) \right]^2}{(l-1)(l+2)[l \cdot (l+1) + \bar{\mathcal{S}}]} \quad (4.21)$$

ermittelt werden kann. Zur exakten Bestimmung des Biegesteifigkeitsmoduls k_c sowie der effektiven Grenzflächenspannung $\bar{\mathcal{S}}$ ist jedoch die Durchführung eines Fits von $\mathbf{n}_q(t)$ als Funktion der Wellenzahl q nötig. Dies ist insofern problematisch, als daß die mittleren quadratischen Amplituden der Konturfluktuation eine komplexe Summe über viele mittlere quadratische Amplituden der Kugelfunktion in Abhängigkeit von den Parametern k_c und $\bar{\mathcal{S}}$ darstellt, so daß die Anpassung aufwendig ist. Aus diesem Grunde wird bei dieser Methode im allgemeinen die effektive Grenzflächenspannung mit $\bar{\mathcal{S}} \cong 0$ vernachlässigt.

4.4.5 Analyse der Konturfluktuationen mit Hilfe der Autokorrelationsfunktion

Die zweite Methode wurde erstmals von Bivas et al. [100] vorgestellt. Sie basiert auf der Analyse der Autokorrelationsfunktion der Konturfluktuationen. Für die normalisierte anguläre Autokorrelationsfunktion $\mathbf{x}(\mathbf{g}, t)$ eines Vesikels mit dem Radius r gilt zu einem Zeitpunkt t [107]

$$\mathbf{x}(\mathbf{g}, t) = \frac{1}{r_o^2} \left[\frac{1}{2\mathbf{p}} \int_0^{2\mathbf{p}} r(\mathbf{j} + \mathbf{g}, t) \cdot r^*(\mathbf{j}, t) d\mathbf{j} - r^2(t) \right]. \quad (4.22)$$

Die zeitlich gemittelte Autokorrelationsfunktion folgt somit der Beziehung

$$\mathbf{x}(\mathbf{g}) = \langle \mathbf{x}(\mathbf{g}, t) \rangle = \sum_{l=2}^{l_{\max}} \sum_{m \neq 0} \left\langle |a_l^m(t)|^2 \right\rangle Y_l^m \left(\frac{\mathbf{p}}{2}, \mathbf{g} \right) Y_l^m \left(\frac{\mathbf{p}}{2}, 0 \right). \quad (4.23)$$

Letztere kann als eine Reihe von Legendre-Polynomen $P_l(\cos \mathbf{g})$ mit den theoretischen Koeffizienten $B_l(\bar{\mathbf{S}}, k_c)$ ausgedrückt werden, welche nach dem Gleichverteilungsprinzip gegeben sind gemäß

$$\mathbf{x}(\mathbf{g}) = \langle \mathbf{x}(\mathbf{g}, t) \rangle = \sum_{l=2}^{l_{\max}} B_l(\bar{\mathbf{S}}, k_c) P_l^0(\cos \mathbf{g}). \quad (4.24)$$

Die Amplituden der Dekomposition stehen in direkter Beziehung zu den Amplituden der Kugelfunktionen, so daß der Biegesteifigkeitsmodul k_c aus der Beziehung

$$B_l(\bar{\mathbf{S}}, k_c) = \frac{kT}{4\mathbf{p}k_c} \cdot \frac{2l+1}{(l-1)(l+2) \cdot [\bar{\mathbf{S}} + l(l+1)]} \quad (4.25)$$

mit $l \geq 2$ erhalten werden kann. Zur Ermittlung des Biegesteifigkeitsmoduls k_c wird die experimentelle Autokorrelationsfunktion für jede Kontur bestimmt und nach Zerlegung in eine Reihe von Legendre-Polynomen werden die theoretischen Koeffizienten erhalten. Hieraus können im Anschluß die Mittelwerte $B_l = \langle B_l(t) \rangle$ berechnet werden.

Zur Ermittlung des Biegesteifigkeitsmoduls k_c und der effektive Spannung $\bar{\mathbf{S}}$ ist ebenfalls eine Datenanpassung von Gleichung (4.25) nötig, diese ist aber im Vergleich zur Fouriermethode weniger komplex.

Der offensichtliche Nachteil dieser Auswertemethode zeigt sich jedoch in der Tatsache, daß experimentell auftretende systematische Fehler nicht direkt nachgewiesen werden können und nur mit Hilfe statistischer Test detektierbar sind. Dies ist insofern problematisch, da die digitale Bildverarbeitung aufgrund des zur Auswertung nötigen hohen Dateninputs automatisiert und zur exakten Konturerkennung eine ausgewogene Balance zwischen Signal und Rauschen hergestellt werden muß. Hierbei können Artefakte generiert werden, die zu erheblichen Abweichungen der Meßwerte führen.

4.4.6 Modifizierte Methode zur Fluktuationsanalyse

Zur Kompensierung der genannten Nachteile erfolgte die Analyse der Fluktuationen in Form einer Kombination der beiden aufgeführten Methoden. Hierzu wurde die Autokorrelationsmethode im Rahmen dieser Arbeit in einer geringfügig modifizierten Form angewandt, um eine direkte Kontrolle der Gültigkeit der erhaltenen Daten zu erzielen. Durch Umstellen von (4.25) erhält man eine Beziehung zwischen den theoretischen Koeffizienten B_l und dem Biegesteifigkeitsmodul k_c

$$U_l(\bar{S}, k_c) = k_c \bar{S} + k_c \cdot l(l+1) \quad (4.26)$$

mit

$$U_l(\bar{S}, k_c) = \frac{kT}{4p} \cdot \frac{2l+1}{B_l(\bar{S}, k_c)(l+2)(l-1)}. \quad (4.27)$$

Aus Gleichung (4.26) wird deutlich, daß die Auftragung der experimentellen Daten in Form eines U_l vs. $l(l+1)$ -Plots ein lineares Verhalten erwarten läßt. Die Ermittlung des Biegesteifigkeitsmoduls k_c kann nunmehr aus der jeweiligen Geradensteigung und die Spannung \bar{S} aus dem Ordinatenschnittpunkt gemäß Abbildung 4-2 ermittelt werden.

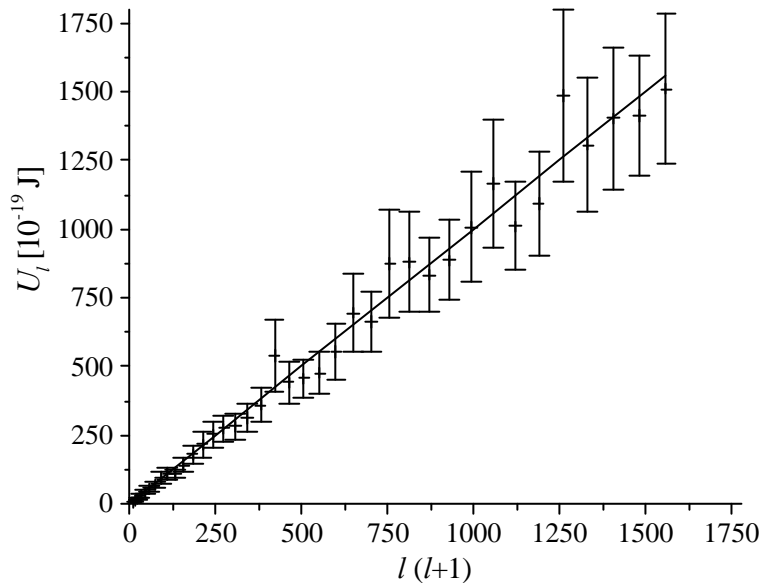


Abbildung 4-2: U_l vs. $l(l+1)$ -Plot simulierter Konturdaten zur Ermittlung des Biegesteifigkeitsmoduls k_c und der effektiven Spannung \bar{S} nach Gleichung (4.26). Die elastischen Konstanten ($k_c = 1.0 \cdot 10^{-19}$ J und $\bar{S} = 0$) können durch fehlergewichtete lineare Datenanpassung (durchgezogene Linie) gemäß der Erläuterung im Text ermittelt werden. Die Fehlerbalken der Legendre-Moden entsprechen der Standardabweichung der Bestimmung.

Der Vorteil der linearen Darstellung liegt in der Möglichkeit der direkten Kontrolle der experimentell erhaltenen Werte auf Anomalien. Der somit ermittelte Wert für die effektive Spannung $\bar{\sigma}$ wird weiterhin für die exakte Bestimmung der Abhängigkeit des Biegesteifigkeitsmoduls k_c von der Wellenzahl q eingesetzt (vgl. Abbildung 4-3). Die jeweiligen erhaltenen Werte von k_c werden im Anschluß auf Übereinstimmung verglichen.

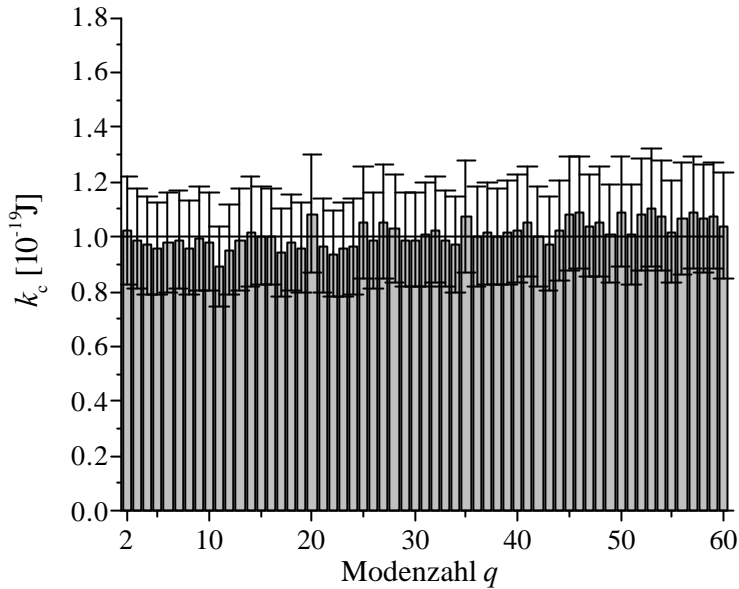


Abbildung 4-3: Abhängigkeit der Biegesteifigkeit k_c von der Modenzahl q nach Gleichung (4.21) für simulierte Konturdaten mit einer effektiven Spannung $\bar{\sigma} = 0$. Die Biegesteifigkeit k_c entspricht dem Plateaubereich mit $k_c = 1.0 \cdot 10^{-19} \text{ J}$ (durchgezogene Linie) und ist für den gesamten betrachteten Bereich der Modenzahlen unabhängig von q .

4.5 Optimierung der Methode der Fluktuationsanalyse

Das vorgestellte theoretische Modell ermöglicht eine direkte Korrelation der mittleren quadratischen Amplituden der thermisch angeregten Formfluktuationen quasi-sphärischer Vesikel mit der Biegesteifigkeit k_c sowie der effektiven Spannung $\bar{\sigma}$. Da die Methode der Fluktuationsanalyse im Rahmen dieser Arbeit etabliert werden sollte, galt es zunächst die Grenzen des Modells im Detail zu charakterisieren, um mögliche Fehlerquellen zu minimieren. Weiterhin mußte die eigentliche Bildanalyse optimiert und bestmöglich an die Videomikroskopie adaptiert werden, da insbesondere Einflüsse in Form von Rauschen oftmals eine erhebliche Beeinflussung des eigentlichen Signals verursachen.

4.6 Numerische Simulationen

Die Meßgenauigkeit der Fluktuationsanalyse wird neben der Natur der Fluktuationen im wesentlichen durch experimentelle Fehlerquellen beeinträchtigt. Hierzu zählt die Ungenauigkeit der Konturanalyse, bedingt durch das begrenzte Auflösungsvermögen des mikroskopischen Systems, aber auch die oftmals begrenzte Anzahl experimentell auswertbarer Konturkoordinaten und der zur Analyse verwertbaren Konturen. In Anbetracht der auftretenden hohen Datenmenge und dem hiermit verbundenen Rechenaufwand ist es ferner wichtig, eine ausgewogene Balance zwischen dem zeitlichen Aufwand und der Präzision der Methode zu konzipieren. Aus diesem Grunde wurde zunächst die Signifikanz der Bestimmungsmethode eingehend untersucht. Um die methodische Präzision und die Grenzen des theoretischen Modells zu charakterisieren, wurden numerisch simulierte Konturdaten untersucht. Anschließend erfolgte eine detaillierte Analyse des möglichen Einflusses experimenteller Ungenauigkeiten basierend auf der numerischen Simulation.

4.6.1 Datensimulation

Die Generierung theoretischer Konturdaten erfolgte numerisch durch Ermittlung der theoretischen Werte der mittleren quadratischen Fourieramplituden bei gegebenem mittleren Vesikelradius, effektiver Spannung und Biegesteifigkeitsmodul k_c gemäß Gleichung (4.21) [108]. Die quadratischen Amplituden einer Kontur erhält man durch anschließende Multiplikation der theoretischen Werte mit einem zufälligen Faktor gemäß einer χ^2 -Verteilung. Die Zerlegung in Sinus- und Cosinus-Komponenten der Fourierserie erlaubt nunmehr die winkelabhängige Projektion der Konturkoordinaten mit zufälliger Phase. Auf diese Weise können Konturen (in Form von x - y Datenpaaren) simuliert werden, die mit 500 Punkten eine realen Vesikeln vergleichbare Anzahl an Konturpunkten aufweisen. Die Analyse der Konturen erfolgt analog der Auswertung experimenteller Daten. Auf diese Weise wird es möglich, potentielle experimentelle Einflüsse auf die Ermittlung der Biegesteifigkeit k_c sowie auf die effektive Spannung $\bar{\sigma}$ zu quantifizieren. Die entsprechenden Eingangsvariablen der Simulationen sind Tabelle 4-1 zu entnehmen.

Tabelle 4-1: Variablen der numerischen Simulation

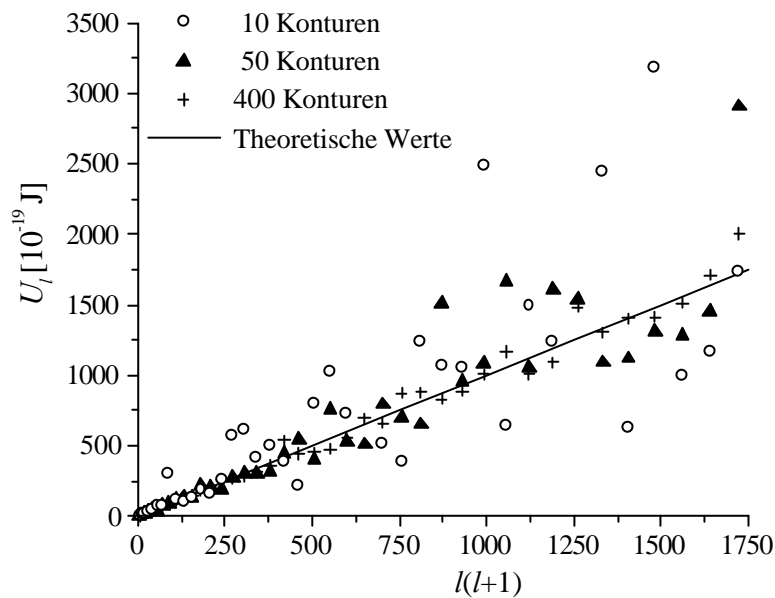
Anzahl simulierter Konturen	400
Punkte pro Kontur	500
Vesikelradius r_0	15.0 μm
Temperatur T	30.0°C

4.6.2 Statistischer Einfluß der verwendeten Konturdaten

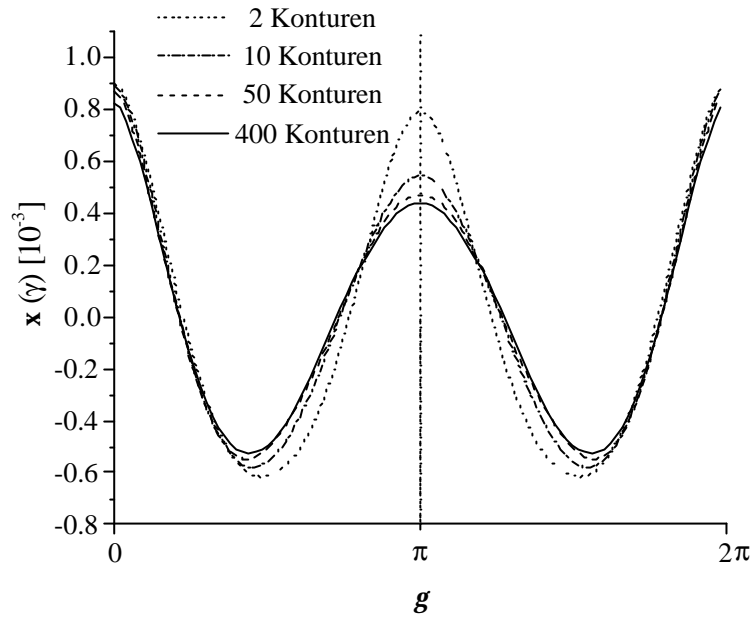
Die thermisch bedingten Formfluktuationen von Vesikeln weisen ihrer Natur nach Zufallscharakter auf. Die Genauigkeit der Messung, deren Theorie auf der Grundlage der statistischen Mechanik beruht, sollte somit direkt proportional der analysierten Datenmenge sein. Voraussetzung hierfür ist, daß die verwendeten Konturen unkorreliert sind. Um die anfallende Datenmenge (die mitunter beträchtliche Anforderungen an die Speicherkapazität des Datenverarbeitungssystems stellen kann) in einem sinnvollen Rahmen zu halten, wurde vorab eine Abschätzung des statistischen Einflusses der Anzahl analysierter Vesikelkonturen durchgeführt.

Abbildung 4-4 zeigt die Ergebnisse der Auswertung simulierter Konturdaten bei gegebener Biegesteifigkeit von $k_c = 1.0 \cdot 10^{-19}$ J und effektiver Spannung $\bar{s} = 0$ unter Variation der Anzahl der verwendeten Konturen.

(a)



(b)



(c)

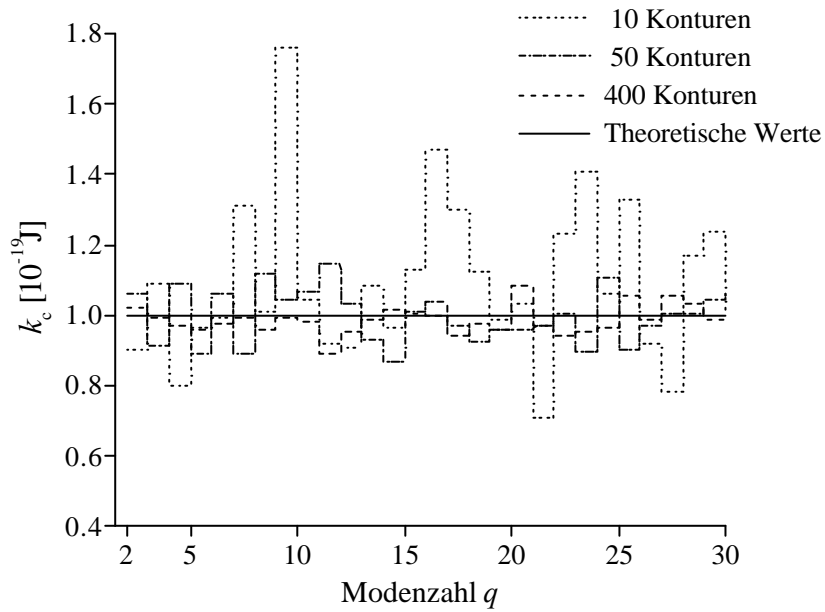


Abbildung 4-4: Statistischer Einfluß der Anzahl eingesetzter Konturen auf die Bestimmung der Biegesteifigkeit k_c . Die verwendeten Konturdaten für ein Vesikel mit $k_c = 1.0 \cdot 10^{-19}$ J und einer effektiven Spannung $\bar{\sigma} = 0$ wurden numerisch simuliert und ohne den Einfluß der Bildverarbeitung nach Gleichung (4.21) ausgewertet. (a) U_l vs. $l(l+1)$ -Plot sowie (b) entsprechende Autokorrelationsfunktion $\mathbf{x}(\mathbf{g})$ als Funktion von \mathbf{g} , (c) Biegesteifigkeit k_c als Funktion der Modenzahl q .

Tabelle 4-2: Ergebnisse der Untersuchung des Einflusses der Anzahl eingesetzter Konturen auf die Analysenmethode. Die Ermittlung der aufgeführten Werte erfolgte über einen Bereich von Modenzahlen $q \leq 50$ bzw. von Quantenzahlen $l \leq 50$.

Werte	Korrelationsmethode	Fouriermethode
n	$k_c [10^{-19} \text{ J}]$	$k_c [10^{-19} \text{ J}]$
10	0.52 ± 2.0	1.10 ± 0.22
50	0.88 ± 0.12	1.01 ± 0.09
100	0.92 ± 0.07	1.00 ± 0.07
400	0.97 ± 0.03	1.00 ± 0.04

Ein Vergleich beider Methoden verdeutlicht die höhere Präzision der Fouriermethode bei geringer Anzahl an Konturen. Eine Anzahl von 50 Konturen ist ausreichend für eine Genauigkeit der Bestimmung der Biegesteifigkeit k_c von $\pm 1 \%$. Schon vergleichsweise kleine Datensätze erlauben somit bei Vernachlässigung der effektiven Spannung eine recht gute Abschätzung der Biegesteifigkeit. Demgegenüber ist bei der Bestimmung der Biegesteifigkeit mit Hilfe der Autokorrelationsfunktion eine vergleichsweise höhere Anzahl an Konturen nötig. Kleine Datensätze führen zu ungünstigen Signal/Rausch-Verhältnissen im Bereich großer Quantenzahlen l und somit zu einer entsprechend hohen Abweichung bei der Bestimmung von k_c .

4.6.3 Einfluß der Membranspannung

Quasi-sphärische Vesikel, die eine sehr geringe Überschußfläche Δ aufweisen, zeigen bei thermisch angeregter Fluktuation positive Werte der effektiven Membranspannung $\bar{\sigma}$. Hierdurch werden die Fluktuationsamplituden reduziert und die Biegesteifigkeit erhöht. Wird die Überschußfläche vernachlässigbar klein, so strebt die Spannung gegen Unendlich. Thermisch angeregte Fluktuationen sind nicht mehr beobachtbar. Hierzu müßten Dehnungsmoden angeregt werden, die weit oberhalb der thermischen Energie liegen. Bei Vergrößerung der Überschußfläche Δ eines Vesikels treten hingegen negative Membranspannungen auf. Die Gültigkeit des theoretischen Modells ist jedoch auf den Bereich kleiner Fluktuationsamplituden im Vergleich zum Vesikelradius beschränkt. Wird $\bar{\sigma} \approx -6$, so divergiert die zweite Harmonik und es erfolgt der Übergang in eine ellipsoide Gestalt. Im folgenden soll der Einfluß der Membranspannungen auf die jeweilige Analysenmethode ermittelt werden. Hierzu wurden erneut nach Gleichung (4.21) Konturdaten simuliert und analysiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4-5 sowie in Abbildung 4-6 dargestellt.

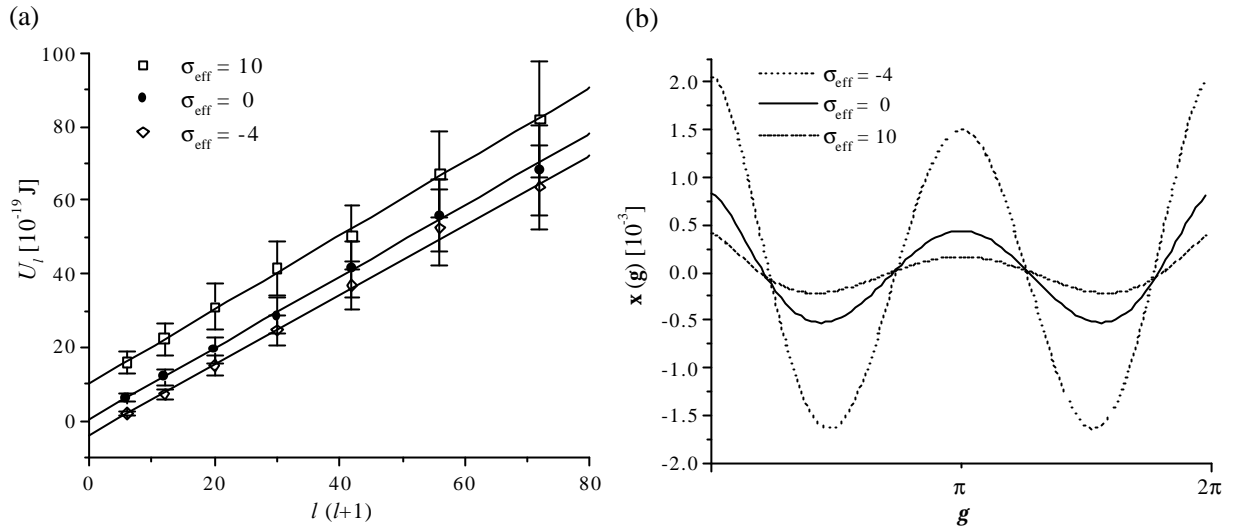


Abbildung 4-5: (a) Einfluß simulierter effektiver Spannungen auf den linearen Verlauf im U_l vs. $l(l+1)$ -Plot in Form der Nullpunktverschiebung des Ordinaten Schnittpunkts bei konstanter Biegesteifigkeit $k_c = 1.0 \cdot 10^{-19}$ J (Darstellung für den Bereich kleiner Quantenzahlen l). Die Grafik (b) zeigt jeweils die entsprechende Autokorrelationsfunktion $x(g)$ als Funktion von g .

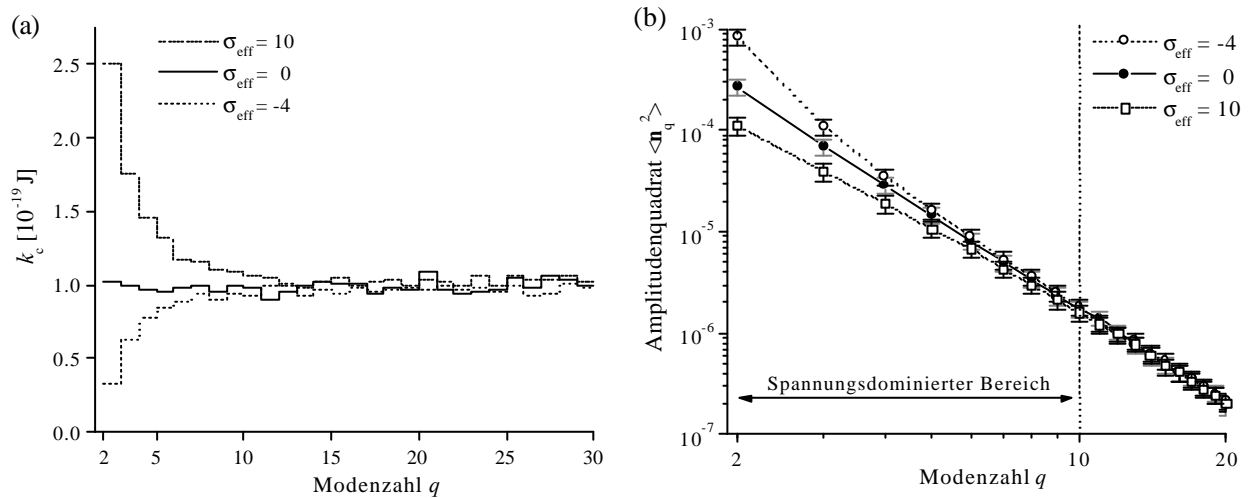


Abbildung 4-6: Einfluß der effektiven Spannung $\bar{\sigma}$ auf die Abhängigkeit der Biegesteifigkeit k_c (a) sowie der mittleren quadratischen Amplituden (b) von der Modenzahl q . Die Bestimmung erfolgte mit Hilfe der Fouriermethode. Der spannungsdominierte Bereich verläuft bis zu Modenzahlen von $q \leq 10$.

Die Membranspannung ist im U_l vs. $l(l+1)$ -Plot gemäß Abbildung 4-5 (a) in Form einer Nullpunktverschiebung des Ordinaten Schnittpunkts detektierbar und führt zu keinerlei Abweichungen vom linearen Verhalten. Demgegenüber liefert die Fouriermethode nach Abbildung 4-6 (a) unter dem Einfluß effektiver Spannungen deutliche Abweichungen der ermittelten Biegesteifigkeiten im Bereich kleiner Modenzahlen von $q = 2 - 10$. Die mittlere-

ren quadratischen Amplituden zeigen in diesem spannungsdominierten Bereich nur eine schwache Abhängigkeit vom Biegesteifigkeitsmodul k_c . Hierdurch werden im Falle der Anwesenheit hoher Spannungen zu hohe und bei niedrigen Spannungen zu niedrige Werte von k_c ermittelt. Da jedoch die separate Ermittlung von \bar{S} mit Hilfe des U_l vs. $l(l+1)$ -Plots möglich ist, kann die entsprechende Korrektur der Fouriermethode zur exakten Bestimmung von k_c sowohl bei positiven als auch negativen effektiven Membranspannungen vorgenommen werden. Hierdurch wird ein Datenvergleich ermöglicht und das Risiko der Bestimmung artifiziieller Ergebnisse minimiert.

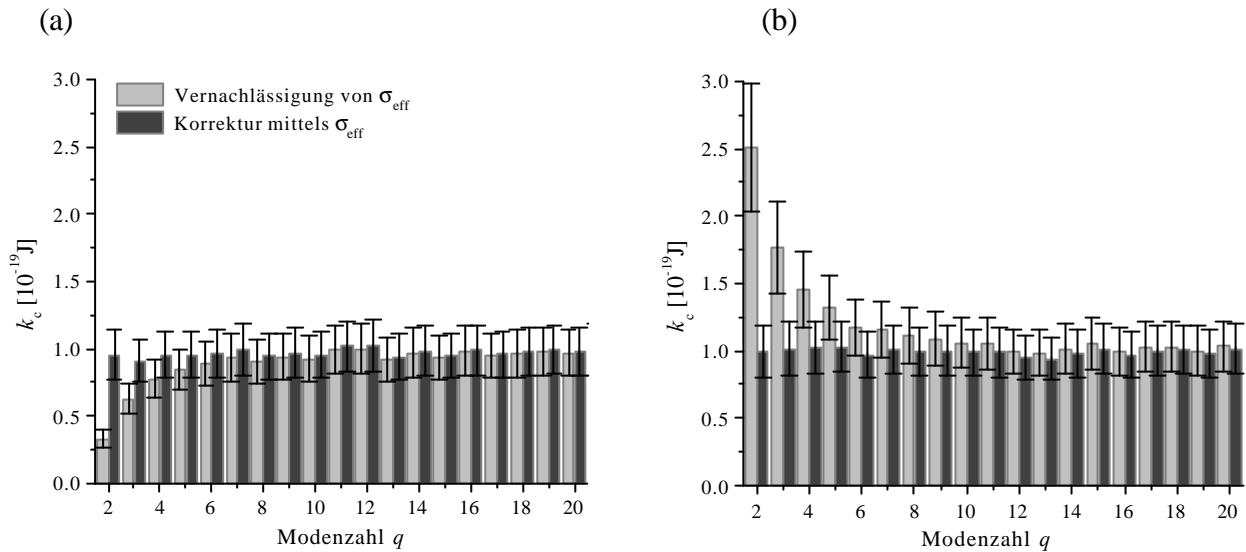


Abbildung 4-7: Verlauf der Biegesteifigkeit k_c als Funktion der Modenzahl q nach Fourieranalyse simulierter Konturdaten mit von Null verschiedenen effektiven Spannungen:

(a) $\bar{S} = -4$ und (b) $\bar{S} = 10$. Die Berechnung erfolgte gemäß (4.21) jeweils unter Vernachlässigung $\bar{S} = 0$ (helle Balken) sowie unter Berücksichtigung der effektiven Spannung $\bar{S} = -4$, bzw. $\bar{S} = 10$ (dunkle Balken).

Die Kombination beider Methoden ermöglicht eine exakte Ermittlung der elastischen Konstanten k_c und \bar{S} unter gleichzeitiger Detektion möglicher Anomalien und liefert ferner wichtige Informationen über die Natur des untersuchten Vesikels aus dem Verlauf des Spektrums der Fourieranalyse. Dies ist im Hinblick auf die Analyse experimenteller Daten von essentieller Bedeutung, da eine Separation des eigentlichen Signals vom experimentell verursachten Rauschen vorgenommen werden muß. Der Einfluß der digitalen Bildverarbeitung sowie des verwendeten optischen Systems soll im folgenden ausführlich diskutiert werden.

4.6.4 Fluktuationsanalyse und Methoden der digitalen Bildverarbeitung

4.6.4.1 Mikroskopieverfahren zur Fluktuationsanalyse

Die optische Untersuchung thermisch bedingter Formfluktuationen von Vesikeln erfordert eine Methode, die eine kontinuierliche Detektion der relativen Deformationen der Membran ermöglicht. Zum Zwecke der Minimierung externer Fehlerquellen ist die Verwendung nicht-invasiver Untersuchungsmethoden, wie die auf der Lichtmikroskopie basierenden Videomikroskopie, bzw. die Video-Kontrastverstärkungs-Mikroskopie, vorteilhaft. Diese ermöglicht die Bestimmung der Biegesteifigkeit durch einfache Beobachtung der Formfluktuationen, ohne das System signifikant zu beeinflussen.

Problematisch zeigt sich jedoch bei der Visualisierung, daß Vesikeln als nahezu nicht absorbierende Objekte nur sehr schwache Kontraste liefern. Diese sind selbst unter Zuhilfenahme von Methoden der digitalen Bildbearbeitung für eine exakte Detektion der Kontur der Vesikelmembran unzureichend. Aus diesem Grund ist für eine präzise Konturanalyse die Auswahl einer geeigneten kontrastverstärkenden Methodik unerlässlich. Diesbezüglich kommen eine Reihe mikroskopischer Verfahren in Betracht, wobei im folgenden die gebräuchlichsten auf ihre Anwendung zur Konturanalyse diskutiert werden sollen.

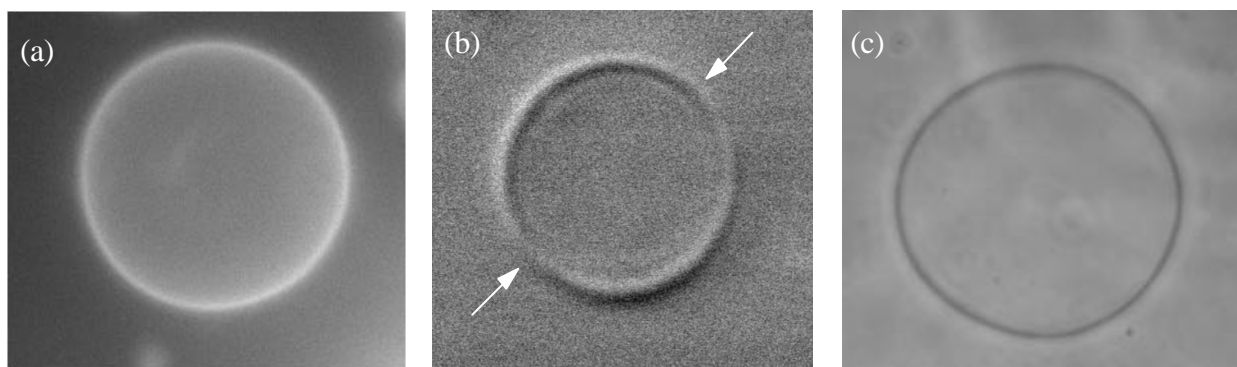


Abbildung 4-8: Vergleich verschiedener lichtmikroskopischer Verfahren zur Visualisierung der Vesikelmembran von Riesenvesikeln. Die Größen der Vesikel sind nicht identisch.

- (a) Aufnahme unter Verwendung der Auflichtfluoreszenzmikroskopie nach Solubilisierung eines lipophilen Fluoreszenzmarkers (Pyren) im Membranbereich
- (b) Differentieller Interferenzkontrast (DIC) nach Nomarski zur scheinbaren perspektivischen Ansicht (die Pfeile kennzeichnen den Wechsel von positivem zu negativem Kontrast)
- (c) Aufnahme mit Hilfe des Phasenkontrastes nach Zernike

Abbildung 4-8 zeigt die Aufnahmen mittels unterschiedlicher Verfahren zur Visualisierung der Vesikelmembran, mit denen eine Fluktuationsanalyse prinzipiell möglich ist [99,100,109]. Die Verfahren weisen jedoch zum Teil erhebliche Nachteile auf.

Die Auflichtfluoreszenzmikroskopie wurde zur Bestimmung elastischer Eigenschaften von Schneider et al. erfolgreich eingesetzt [99]. Nachteil dieser Methode ist jedoch zum einen die mäßige örtliche Auflösung, die durch die geringe Lichtintensität der Fluoreszenz hervorgerufen wird. Weitaus problematischer ist zum anderen die notwendige Verwendung von Fluoreszenzmarkern, die als Fremdmoleküle ihrerseits Einfluß auf die zu untersuchenden physikalischen Membraneigenschaften nehmen [107]. Da es sich bei Vesikeln um Phasenobjekte handelt, ist eine sehr gängige Methode der Visualisierung der Vesikelmembran die Verwendung des differentiellen Interferenzkontrastes (DIC) [100], insbesondere in Kombination mit der Video-Kontrastverstärkungs-Mikroskopie (VEC-DIC) [80]. Diese Methode liefert Bilder mit hoher Auflösung und plastischem Eindruck (vgl. Abbildung 4-8 (b)). Das hierbei verwendete charakteristische Doppelstrahlverfahren hat allerdings einen für die Konturextraktion entscheidenden Nachteil: die Kontur der Vesikel ist nur innerhalb der vorgegebenen Richtung gut extrahierbar. In der hierzu senkrechten Orientierung findet ein Kontrastwechsel statt, der dazu führt, daß an dieser Stelle keine eindeutige Konturanalyse möglich ist (vgl. Abbildung 4-8 (b)). Aus diesem Grund findet die Methode des DIC bei der Bestimmung der Biegesteifigkeit nur selten Verwendung [100], ist jedoch bei der auf Längenänderungen basierenden Mikropipettentchnik verbreitet [110]. Die geeignetste Alternative ist die sogenannte Phasenkontrastmikroskopie, einer Methode zur Visualisierung von Phasenobjekten, d.h. von Objekten, die nur die Phase, aber nicht die Amplitude des Lichtes beeinflussen. Diese Technik liefert zwar eine vergleichsweise geringere Auflösung, indes einen ausgeprägten isotropen Kontrast und ist infolgedessen zur Konturextraktion mit Hilfe der digitalen Bildverarbeitung sehr gut geeignet.

4.6.5 Experimenteller Aufbau

In Anbetracht der diskutierten Vor- und Nachteile der verschiedenen Verfahren zur Visualisierung quasi-sphärischer Vesikel erfolgte die Fluktuationsanalyse unter Verwendung der Phasenkontrastmikroskopie. Im Rahmen dieser Arbeit wurde hierzu ein Phasenkontrastmikroskop installiert. Die Adaption einer digitalen CCD-Kamera ermöglichte eine nachgeschaltete rechnergestützte digitale Bildverarbeitung. Die Unendlich-Optik des Mikroskops erlaubt die Verwendung eines Vergrößerungswechslers (neben einem 5-fach Zoomokular) und somit eine variable, nahezu beliebige Nachvergrößerung zur Projektion auf den CCD (charge-coupled device)-Chip einer hochauflösenden Kamera. Hieraus ergibt sich eine optimale Ausnutzung der Bildfläche zur Bildanalyse auch bei unterschiedlichen Vesikelgrößen.

Bei dem verwendeten Kamerasystem wurde entgegen der in der Literatur üblichen Verwendung herkömmlicher Videokameras eine hochauflösende 12-Bit-monochrome CCD-Kamera mit Peltierkühlung und „lens-on-chip-Technologie“ verwendet. Diese verfügt im Gegensatz zu den herkömmlichen Systemen über eine elektronische Verschußblende und erlaubt somit eine definierte Wahl der Belichtungszeit. Hierdurch wird eine exakte Kontrolle der Zeitauflösung möglich und die numerische Korrektur der durch die Video-Integrationszeit verursachten Fehler überflüssig [111]. Das Kamerasystem weist weiterhin eine hohe Linearität in der örtlichen, sowie in der Intensitätsauflösung auf, wobei der digitale Datentransfer zu einem Personalcomputer ein günstiges Signal/Rausch-Verhältnis ermöglicht. Ferner kann durch die hohe Graustufentiefe eine sehr exakte Detektion von Intensitätsgradienten und somit eine präzise Konturdetektion durchgeführt werden.

Für die Fluktuationsanalyse wurden üblicherweise Bilder in Zeitabständen von einer Sekunde aufgenommen, gespeichert und in einem späteren Schritt der Konturextraktion zugeführt. Da die anfallende Datenmenge aufgrund der großen Anzahl benötigter Konturen recht hoch ausfiel, wurde für Standarduntersuchungen der relevante Bildausschnitt ROI (region of interest) auf 640×512 Pixel (picture elements) beschränkt.

4.6.6 Digitale Bildverarbeitung und Prinzip der Bildanalyse

Die Bildbearbeitung liefert eine Methode zur Aufarbeitung der digitalen Bildinformation, die für eine exakte Ermittlung der Konturkoordinaten oftmals unerlässlich ist. Hierbei können mit Hilfe homogener Punktoperationen die Grauwerte in Echtzeit unter Verwendung spezieller Tabellen, sogenannter „look-up-tables“ (LUT) modifiziert und somit kontrastreiche Darstellungen erzielt werden. Inhomogene Punktoperationen sind vergleichsweise aufwendiger, da die jeweilige Funktion für jedes Pixel separat berechnet werden muß. Da bei den Untersuchungen oftmals ungleichmäßig ausgeleuchtete Bilder auftraten, die die Qualität der anschließenden Bildverarbeitung beeinträchtigten, waren zeitaufwendige Intensitätskorrekturen unerlässlich. Auf die Subtraktion des Bildhintergrundes in Form von „out-of-focus“-Aufnahmen zur Korrektur inhomogener Beleuchtungen und Linsenfehlern wurde im allgemeinen verzichtet.

Die Bildverarbeitung dient zur exakten Detektion der Vesikelkontur (Abbildung 4-9). Hierbei liegt die Annahme zugrunde, daß die exakte Position der Membran im Bereich der Konturpunkte mit maximalem Kontrast und minimaler Intensität liegt. Die so ermittelten Konturdaten werden anschließend numerisch ausgewertet.

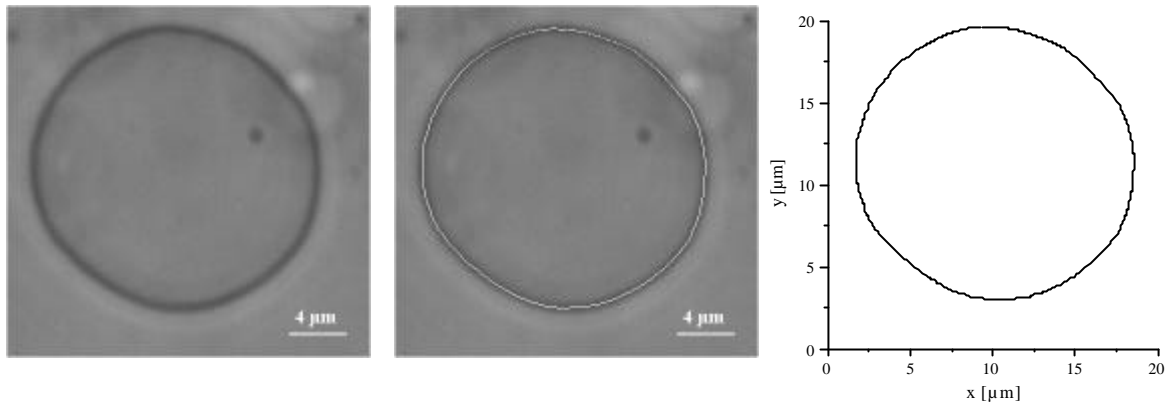


Abbildung 4-9: Prinzip der Konturextraktion der äquatorialen Vesikelebene:

- (a) Die Phasenkontrastmikroskopie liefert zu einem Zeitpunkt t ein Abbild der Vesikelmembran in der äquatorialen Vesikelebene in Form einer dunklen Kontur auf hellem Untergrund. Das Intensitätsprofil entspricht einer maximalen Graustufentiefe von 4096 Graustufen bei einer Pixelgröße von 64 nm.
- (b) Die Detektion der Konturkoordinaten erfolgt mit Hilfe der Bildverarbeitungssoftware Optimas 6.0 unter Verwendung des Algorithmus nach Liu [112]. Die exakte Position der Vesikelmembran wird definiert als der Bereich der Konturpunkte des Bildes mit maximalem Kontrast (d.h. minimaler Intensität) innerhalb der dunklen Kontur.
- (c) Die extrahierten Konturdaten werden in Form von x,y -Koordinaten der theoretischen Datenanalyse zur Bestimmung der elastischen Konstanten zugeführt.

Aufgrund der großen Datenmenge mit einem Minimum von etwa 300 Bildern pro Messung war eine Automatisierung der Bildbearbeitung und anschließenden Konturdetektion (in Form einer implementierten Makroroutine) unerlässlich. Die Daten wurden mit Hilfe eines in C++ geschriebenen Programms ausgewertet.

Bei den Untersuchungen wurden ausschließlich einzelne, frei im Medium dispergierte Vesikel untersucht. Diese zeigen durch die Brown'sche Molekularbewegung bedingte Translationen in der Beobachtungsebene wie auch entlang der optischen Achse. Die Bewegung in der Beobachtungsebene wird hierbei durch die separate Berechnung des Vesikelzentrums für jedes Bild berücksichtigt. Die Translation entlang der optischen Achse kann nur durch ständige Fokussierung während der Aufnahmen kompensiert werden. Hierbei treten dennoch gelegentlich defokussierte oder „verschmierte“ Aufnahmen auf, deren Konturen nur unvollständig ausgewertet werden können. Aus diesem Grund wurden die Konturen zunächst fouriertransformiert und in Form der ersten 5 Terme dargestellt. Experimentell auftretende Abweichungen können durch binominale Glättung korrigiert oder vollständig

gelöscht werden. Weichen mehr als 5 % der Punkte einer Kontur ab, so wird die gesamte Kontur verworfen. Die Verwendung einer binominalen Konturglättung zeigte sich jedoch als sehr kritischer Parameter, der oftmals zu Artefakten in der Messung führen kann, so daß im allgemeinen auf derartige Korrekturen verzichtet wurde. Erfolgt bei mehr als 10 % der Konturen eine Korrektur, so wird die gesamte Sequenz nicht verwendet.

4.6.7 Einfluß der Bildbearbeitung und der Auflösung

Die zur Bildanalyse nötige Bildbearbeitung wie auch der zur Konturdetektion verwendete Algorithmus können potentielle Fehlerquellen bei der Bestimmung der Biegesteifigkeit k_c darstellen. Zur Charakterisierung dieser Einflüsse wurden durch numerische Simulation erzeugte, zweidimensionale Konturdaten für gegebene Biegesteifigkeiten und effektive Spannungen in binäre Bilddaten umgewandelt und entsprechend der Konturanalyse realer Vesikel analysiert. Ein Vergleich der Ergebnisse beider Methoden in Abbildung 4-10 und Abbildung 4-11 verdeutlicht den unterschiedlichen Einfluß des auf diese Weise generierten Rauschens.

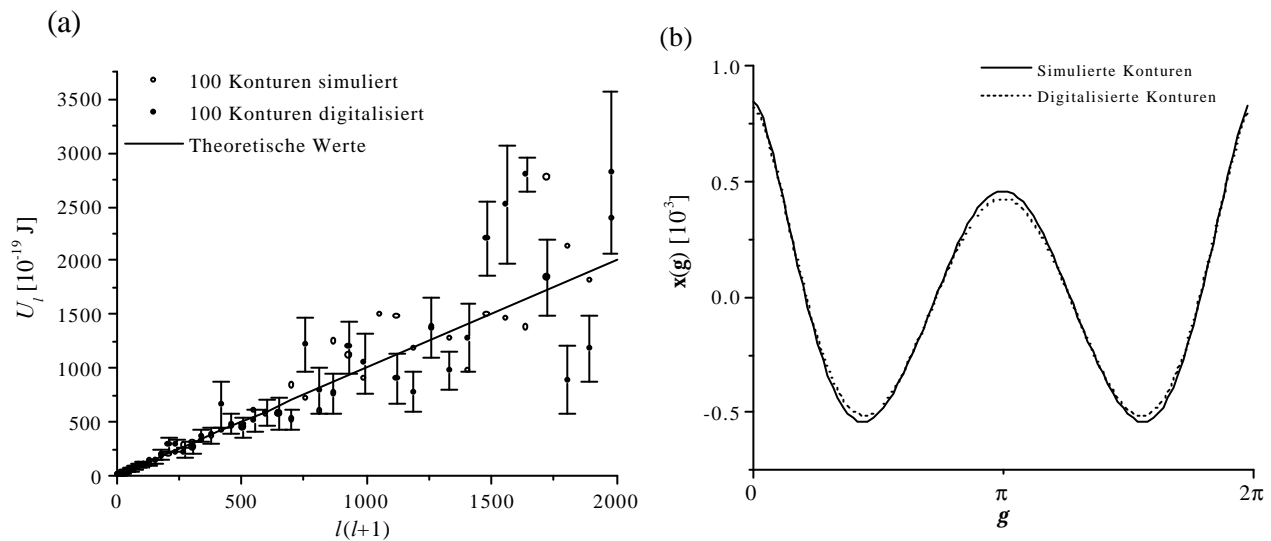
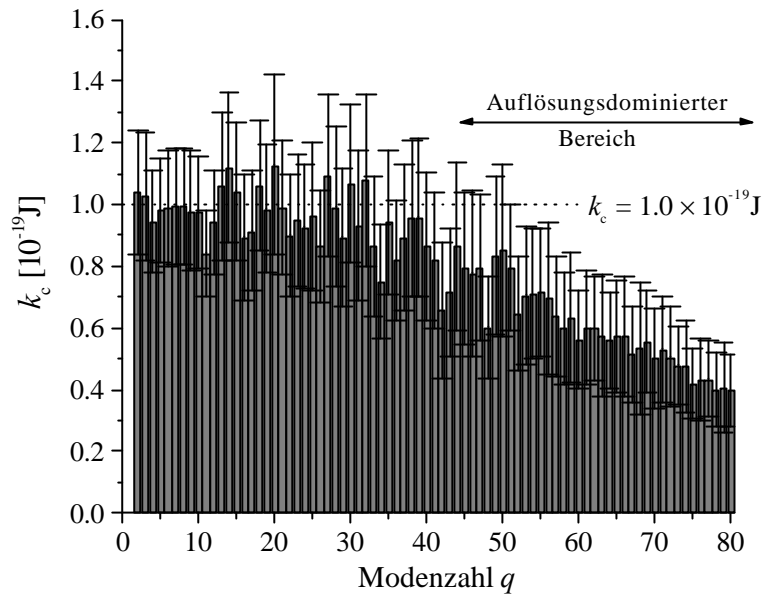


Abbildung 4-10: Untersuchung des Einflusses der digitalen Bildverarbeitung auf die Ermittlung der elastischen Konstanten mit Hilfe der Autokorrelationsfunktion. U_l vs. $l(l+1)$ -Plot der theoretischen Werte (durchgezogene Linie) $k_c = 1.0 \cdot 10^{-19}$ J und $\bar{\sigma} = 0$. Grafik (a) zeigt den Vergleich der Analyse numerisch simulierter Konturdaten (\circ), sowie der simulierten Konturdaten nach Umwandlung in entsprechende „Vesikelbilder“ mit einer Größe von 512×512 Pixel mit anschließender Bildbearbeitung und Konturextraktion (\bullet). Grafik (b) zeigt den entsprechenden Verlauf der Autokorrelationsfunktion $x(g)$ als Funktion von g .

(a)



(b)

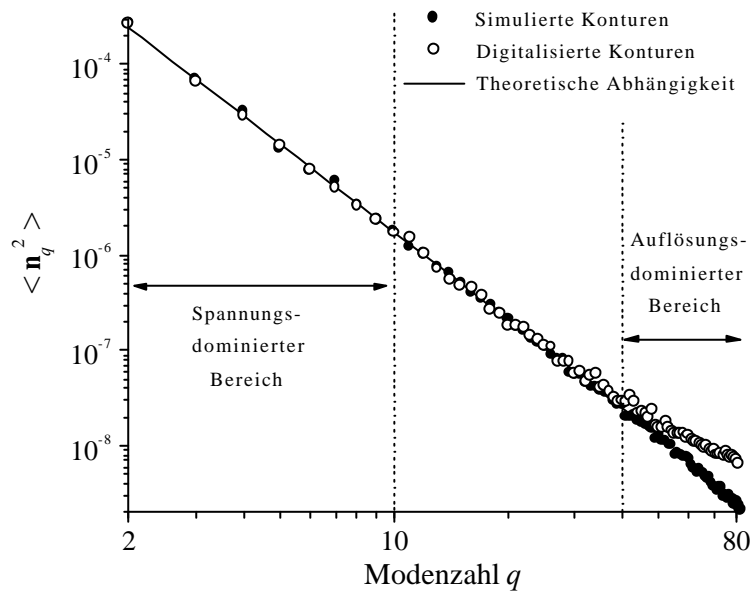


Abbildung 4-11: Einfluß der digitalen Bildverarbeitung auf die Abhängigkeit der Biegesteifigkeit k_c (a) sowie der mittleren quadratischen Amplituden (b) von der Modenzahl q . Analyse numerisch simulierter binärer Konturdaten ($N = 100$) mit $k_c = 1.0 \cdot 10^{-19}$ J und $\bar{s} = 0$ bei einer Bildgröße von 512×512 Bildpunkten.

Während der Einfluß der Bildverarbeitung auf die Ergebnisse der mit Hilfe der Autokorrelationsfunktion gewonnenen Daten vernachlässigbar ist, zeigt die Fouriermethode im Bereich hoher Modenzahlen q deutliche Abweichungen. Hierbei handelt es sich um ein auflösungsbedingtes Phänomen. Eine Variation der Auflösung der simulierten Daten in Abbildung 4-12 führt zu entsprechenden unterschiedlichen „Cut-offs“ im Bereich hoher Modenzahlen q . Im auflösungsdominierten Bereich wird die Biegesteifigkeit abhängig von der Modenzahl q . Hierdurch kommt es bei der in Abbildung 4-11 gewählten Auflösung von 512×512 Pixel oberhalb eines Cut-offs von $q = 40$ zu einer Unterbestimmung von k_c . Diese Auflösung entspricht im wesentlichen den folgenden experimentellen Auflösungen realer Vesikel.

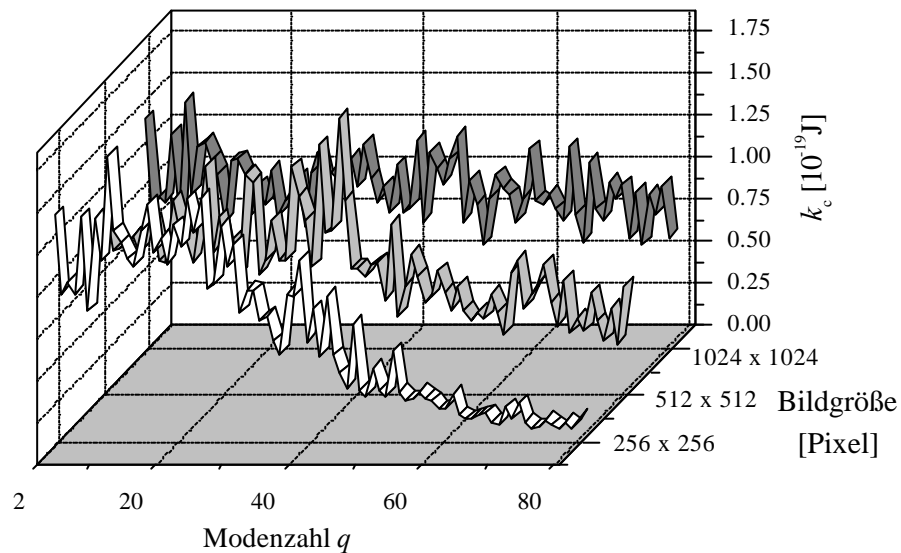


Abbildung 4-12: Fourieranalyse simulierter Vesikelbilder ($N = 20$) unterschiedlicher Auflösung von 256×256 , 512×512 sowie 1024×1024 Bildpunkten. Während bei einer Auflösung von 1024×1024 Pixel die ermittelte Biegesteifigkeit für den gesamten Modenbereich unabhängig von der Modenzahl q ist, verschiebt sich mit sinkender Pixelzahl der Cut-off zu kleineren Modenzahlen. Somit sinkt die Anzahl der auswertbaren Moden, da die limitierte Auflösung im Bereich hoher Modenzahlen zu einer Unterbestimmung der Biegesteifigkeit führt.

4.6.8 Zeitliche Auflösung

Neben der räumlichen Auflösung, die im wesentlichen durch die Qualität des optischen Systems und die optimale Ausnutzung des CCD-Chips gegeben ist, wird die zeitliche Auflösung durch den Einfluß der Integrationszeit der CCD-Kamera limitiert. Üblicherweise kommen bei den Untersuchungen herkömmliche Videokameras mit automatisch geregelter Belichtungszeit und einer Rate von 25 Bildern pro Sekunde zum Einsatz. Diese weisen maximale Integrationszeiten von 40 ms auf.

Sehr schnelle Bewegungen von Objekten wie der fluktuierenden Membran können jedoch bei zu großer Belichtungszeit nicht mehr exakt lokalisiert werden. Sie führen zu einem „Verschmieren“ der Kontur und zu einer verminderten räumlichen Auflösung. Es können somit nur solche Moden präzise bestimmt werden, deren Korrelationszeit größer als die Integrationszeit der CCD-Kamera ist. Aus diesem Grunde wird bei Verwendung der Autokorrelationsmethode zur Vermeidung der Überbestimmung von k_c oftmals auf einen Korrekturfaktor zurückgegriffen [91]. Auf diese Weise wird der Einfluß der Integrationszeit durch eine Korrektur der Amplituden der Legendre-Polynome berücksichtigt. Da jedoch nicht gänzlich auszuschließen ist, daß eine derartige Korrektur wiederum zu einer fehlerhaften Bestimmung der Biegesteifigkeit führen kann, wird im Rahmen dieser Arbeit auf eine numerische Korrektur verzichtet. Neben der Möglichkeit der Verwendung eines Stroboskops zur Beleuchtung [111] besteht eine weitere Möglichkeit, die genannte Problematik zu umgehen, in der Verwendung einer CCD-Kamera mit elektronisch geregelter Verschußblende [111]. Letztere wurde im Rahmen dieser Arbeit verwendet. Mit Hilfe dieser Verschußblende ist es möglich, die Belichtungszeit exakt einzustellen und somit die zeitliche Auflösung präzise zu definieren.

Durch theoretische Berechnung der Relaxationszeiten einzelner Moden ist es möglich den signifikanten Modenbereich für eine gegebene Verschußzeit zu verifizieren. Werte außerhalb dieses Bereiches bleiben für die Berechnung der elastischen Konstanten unberücksichtigt. Die Zeitabhängigkeit der Fluktuationen kann mit Hilfe der zeitabhängigen Autokorrelationsfunktion beschrieben werden. Jede Ordnung l der Formfluktuation eines Vesikels weist eine charakteristische Relaxationszeit t_l auf. Ausgedrückt in einer Reihe von Legendre-Polynomen mit den Amplituden $B_l(t, \bar{s}, k_c)$ folgt für die Relaxation [102,108]

$$B_l(t + t, \bar{s}, k_c) = B_l(t, \bar{s}, k_c) \cdot e^{\left(-\frac{t}{t_l}\right)}. \quad (4.28)$$

Die Relaxationszeit ist gemäß

$$t_l = \frac{hr_0^3}{k_c} \cdot \frac{(2l+1)}{(l+2)(l-1)[\bar{s} + l(l+1)]} \cdot \frac{(2l^2 + 2l - 1)}{l(l+1)} \quad (4.29)$$

näherungsweise invers proportional zur dritten Potenz der Ordnung l , wobei h die Viskosität des Mediums darstellt.

Ist die Integrationszeit der Video-Kamera größer als die Relaxationszeit, so wird die α -mittelte Amplitude kleiner als der Realität entsprechend und der Wert für k_c überbestimmt. Bei gegebener Vesikelgröße kann der jeweilige Cut-off anhand von Abbildung 4-13 bestimmt werden.

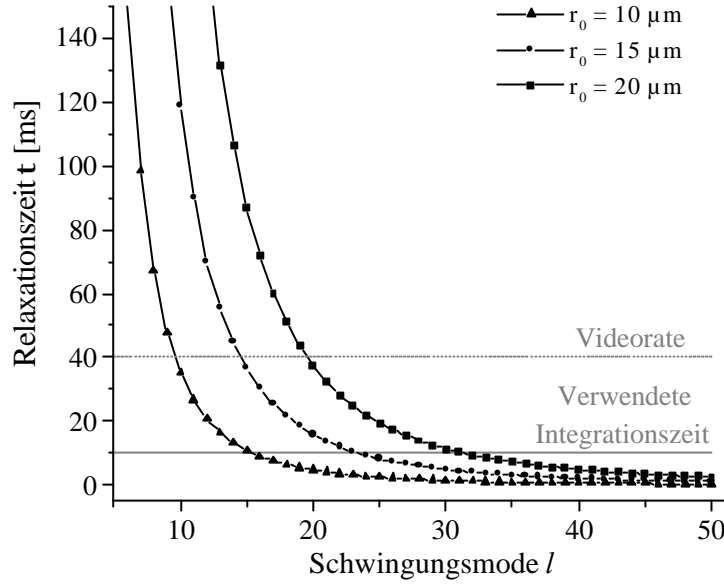


Abbildung 4-13: Vergleich der theoretisch ermittelten Relaxationszeiten für Vesikel unterschiedlicher Äquivalentenradien r_0 , sowie $k_c = 1.0 \cdot 10^{-19} \text{ J}$, $\bar{S} = 0$ und $h = 0.891 \text{ mPa} \cdot \text{s}$ mit einer Kameraintegrationszeit von 10 ms zur Ermittlung des Cut-offs.

Für die Relaxationszeit t_q der Modenzahlen q gilt nach Méléard eine analoge Abhängigkeit gemäß [108]

$$t_q = \frac{hr_0^3}{k_c} \cdot \frac{(2q+1)}{(q+2)(q-1)[\bar{S} + q(q+1)]} \cdot \frac{(2q^2 + 2q - 1)}{q(q+1)}. \quad (4.30)$$

Der auflösungsbedingte Einfluß auf die Bestimmung der elastischen Konstanten ist in Abbildung 4-14 anhand des U_l vs. $l(l+1)$ -Plots am Beispiel eines realen Vesikels exemplarisch erläutert.

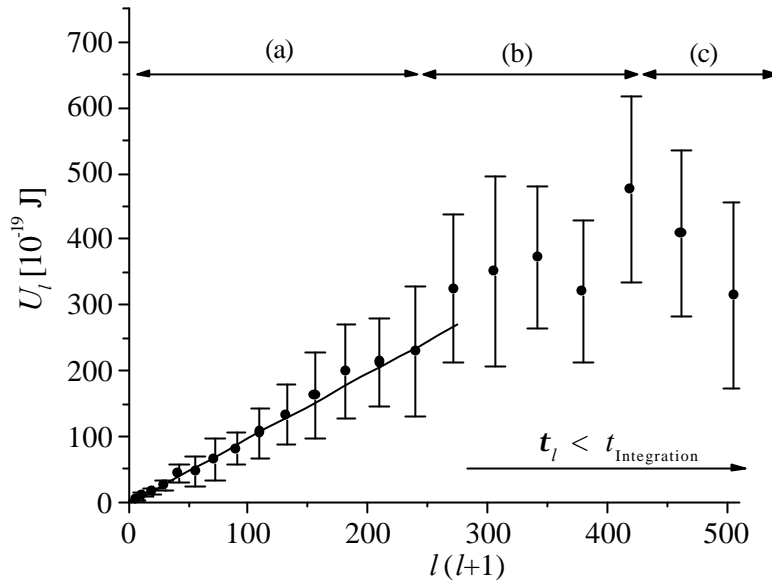


Abbildung 4-14: U_l vs. $l(l+1)$ -Plot eines realen Vesikels mit einem Äquivalentradius $r_0 = 9.8 \mu\text{m}$ ($k_c \approx 1 \cdot 10^{-19} \text{ J}$, $\bar{s} = -3$). Der theoretisch ermittelte Cut off von $t_{15} = 11 \text{ ms}$ stimmt mit dem experimentell beobachtbaren überein. Somit ist der Bereich der zur linearen Regression verwendbaren Daten (a) auf Werte bis $l = 15$ beschränkt. Werte oberhalb (b) des Cut-offs führen zu einer Überbestimmung von k_c . Der Bereich (c) wird allein durch die räumliche Auflösung limitiert.

4.6.9 Abschätzung des Meßbereich

Der Meßbereich der vorgestellten Methode zur Bestimmung der Biegesteifigkeit k_c einzelner Vesikel kann in guter Näherung mit $1 \cdot 10^{-20} \text{ J} < k_c < 1 \cdot 10^{-18} \text{ J}$ abgeschätzt werden. Der Bereich kleiner Biegesteifigkeiten ($k_c \leq 1 \cdot 10^{-20} \text{ J}$) wird durch die hohen Amplituden der thermischen Fluktuationen (vgl. Abbildung 4-15 a) limitiert. Hiermit verbunden ist eine Abweichung von der theoretischen Annahme der quasi-sphärischen Vesikelgestalt und der Verlust der Gültigkeit des theoretischen Modells. Andererseits kann die exakte mikroskopische Ermittlung der Kontur nicht mehr realisiert werden, da die Fluktuationsamplituden aufgrund der begrenzten Tiefenschärfe des Mikroskops und der Limitierung durch die Integrationszeit der Videokamera zu einem „Verschmieren“ des mikroskopischen Bildes führen.

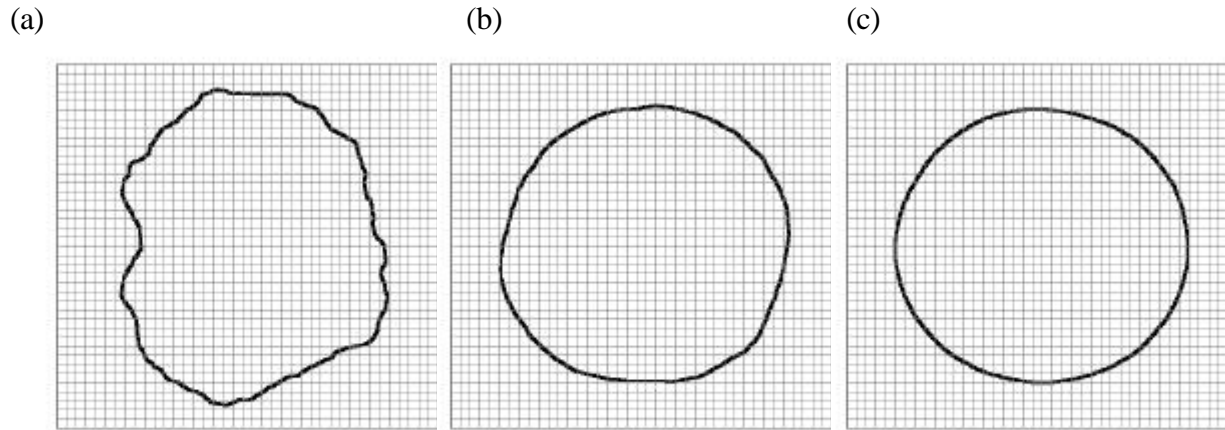


Abbildung 4-15: Einfluß der Biegesteifigkeit k_c auf die Morphologie numerisch simulierter Vesikelkonturen ($\bar{S} = 0$): (a) $k_c = 1 \cdot 10^{-20}$ J, (b) $k_c = 1 \cdot 10^{-19}$ J sowie (c) $k_c = 1 \cdot 10^{-18}$ J.

Im Bereich hoher Biegesteifigkeiten $k_c \geq 1 \cdot 10^{-18}$ J sinken die Fluktuationsamplituden hingegen ab, so daß das Auflösungsvermögen des Mikroskops der limitierende Faktor wird. Eine geringfügige Steigerung des Signal/Rausch-Verhältnisses ist gegebenenfalls durch die Verwendung hochaperturiger Linsensysteme zu gewährleisten.

4.6.10 Diskussion

Die vorgestellte kombinierte Methode zur präzisen Analyse der Formfluktuationen einzelner quasi-sphärischer Vesikel ermöglicht die Bestimmung der Biegesteifigkeit k_c im Bereich von $1 \cdot 10^{-20}$ J bis $1 \cdot 10^{-18}$ J unter gleichzeitiger Ermittlung der effektiven Spannung. Die gewählte grafische Präsentation erlaubt eine direkte Beurteilung der Meßergebnisse ohne hohen statistischen Aufwand, so daß spannungs- sowie auflösungsdominierte Bereiche innerhalb der Spektren detektiert werden können. Die Präzision der Methode ist abhängig von der Größe der untersuchten Vesikel sowie der Anzahl der verwendeten Konturdaten. Ferner bestimmt bei konstanter Vesikelgröße die Belichtungszeit der CCD-Kamera den Bereich signifikanter Moden.

Der Vergleich beider Meßmethoden zeigt, daß die Fouriermethode eine auf experimentelle Einflüsse unempfindliche Analysenmethode darstellt. Diese kann ohne großen statistischen Aufwand zur Ermittlung der Biegesteifigkeiten von Vesikeln im Bereich vernachlässigbarer effektiver Spannungen herangezogen werden. Tritt das Rauschen in Form eines weißen Rauschens auf, so wird es den einzelnen Moden gleichmäßig überlagert [107]. Experimentell verursachtes Rauschen führt hingegen zu einem Fehler, der mit steigender Datenmenge durch ein verbessertes Signal/Rausch-Verhältnis minimiert werden kann. Die Restriktion der zeitlichen wie auch der optischen Auflösung bewirkt lediglich eine Reduktion des Plateaus signifikanter Moden. Bei der gewählten Versuchsanordnung dominiert die zeitliche Auflösung.

Eine exakte Bestimmung der Biegesteifigkeit k_c unter gleichzeitiger Ermittlung der effektiven Spannung $\bar{\sigma}$ wird durch simultane Analyse der Konturfluktuationen mit Hilfe der Autokorrelationsfunktion ermöglicht. Diese Methode erfordert einen relativ hohen Input an Konturdaten und stellt vergleichsweise hohe Ansprüche an die Speicherkapazität sowie die Rechnerleistung. Vorteilhaft ist jedoch der geringe Einfluß experimentell verursachten Rauschens, welches dem Signal lediglich in Form einer δ -Funktion überlagert wird.

4.7 Fluktuationsanalyse von Vesikeln

Die Fluktuationsanalyse wurde zur Bestimmung der elastischen Eigenschaften riesiger fluider DMPC-Vesikel eingesetzt und im Anschluß der Einfluß von solubilisiertem Toluol als lipophiles Solubilisat konzentrationsabhängig untersucht. Die Darstellung der Vesikel erfolgte mit Hilfe der Quellmethode nach Reeves und Dowben [33]. Diese liefert eine hohe Ausbeute an Vesikeln mit großer Überschußfläche und effektiven Spannungen im Bereich von $\bar{\sigma} = -5$ bis $\bar{\sigma} = 15$. Die Ausbeute an unilamellaren Vesikeln ist verglichen zur Methode der Elektropräparation [113] geringer. Die Einstellung konstanter Toluol/DMPC-Verhältnisse erwies sich jedoch unter Verwendung der Elektropräparation aufgrund des hohen Dampfdrucks von Toluol als äußerst problematisch.

4.7.1 Die Bedeutung der effektiven Membranspannung von Vesikeln

Die Amplituden der thermischen Fluktuationen frei fluktuierender Vesikel hängen sowohl von der Biegesteifigkeit k_c als auch von der effektiven Spannung $\bar{\sigma}$ der Membran ab. Letztere wirkt nach Gleichung (4.15) in Form einer reduzierten Spannung auf die Fluktuationsamplituden. Die quadratische Abhängigkeit vom Vesikelradius hat zur Folge, daß selbst kleinste laterale Spannungen ($\sigma \geq 10^{-5} \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$) einen deutlichen Einfluß auf die Fluktuationsamplituden ausüben. Liegen laterale Spannungen von $10^{-3} \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$ vor, so erscheinen die Vesikel rigide und sind für die Fluktuationsanalyse ungeeignet [93]. Die effektive Spannung eines Vesikels ist eine für das jeweilige Vesikel individuelle Größe, die sehr stark von den Bedingungen zum Zeitpunkt des Membranschlusses zur Vesikelstruktur und somit von den Präparationsbedingungen abhängen kann. Sie spiegelt die Überschußfläche Δ wieder, die das Vesikel im Vergleich zur Fläche einer Kugel gleichen Volumens aufweist und die für die Formfluktuationen zur Verfügung steht. Diese ist somit von Vesikel zu Vesikel sehr unterschiedlich (Abbildung 4-16).

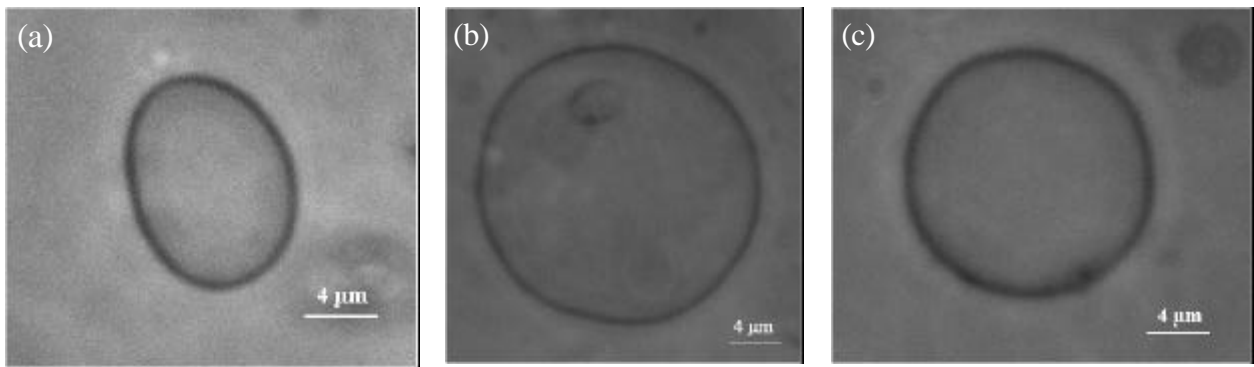


Abbildung 4-16: Typische Vesikelgestalt von DMPC-Vesikeln in Abhängigkeit von der Membranspannung.

(a) $\bar{S} = -5.3$, $r_0 = 4.7 \mu\text{m}$, $S = -1.9 \cdot 10^{-5} \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$

(b) $\bar{S} = 1$, $r_0 = 10.4 \mu\text{m}$, $S = 1.4 \cdot 10^{-9} \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$

(c) $\bar{S} = 13.5$, $r_0 = 7.5 \mu\text{m}$, $S = 4.3 \cdot 10^{-8} \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$

4.7.2 Formfluktuationsanalyse unter isothermen Bedingungen

4.7.2.1 Aufbau des Meßsystems

Die elastischen Eigenschaften von Vesikeln stellen temperaturabhängige Größen dar. Aus diesem Grunde ist für die Untersuchung die Gewährleistung einer Temperaturkonstanz während der Messung Voraussetzung. Hierzu wurde der in Abbildung 4-17 dargestellte temperierbare Objektisch konstruiert.

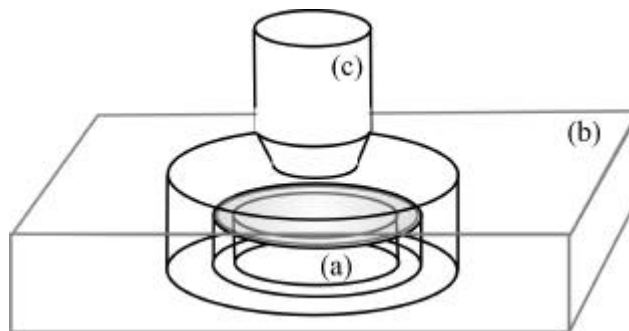


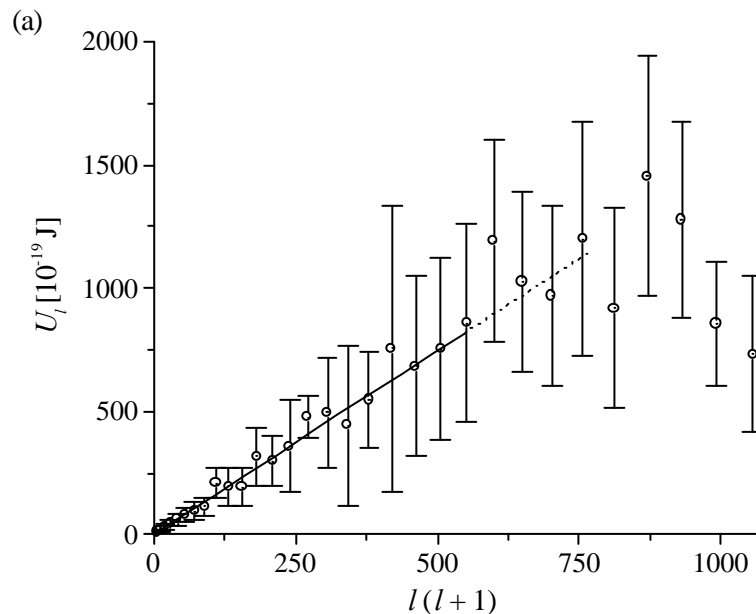
Abbildung 4-17: Temperierbarer Objektisch zur Verwendung in der Durchlicht- sowie der Auflichtfluoreszenzmikroskopie. Der Tisch besteht aus einem Metallblock (b), der mit Heizspiral durchzogen ist. Über einen Kryostaten wird die innere Objektkammer mit der probengefüllten Mikroküvette (a) temperiert und die Probe mit Hilfe eines Phasenkontrastobjektives (c) beobachtet.

Vorteil dieser Konstruktion ist die Möglichkeit der Verwendung von Ölimmersionslinsensystemen hoher numerischer Apertur und speziell eines Ölimmersionskondensors, so daß bei Durchlichtuntersuchungen optimale Auflösungen erzielt werden können.

Der Objektisch wird über einen Kryostaten extern temperiert und kann in einem Temperaturbereich von 0°C - 60°C betrieben werden. Der Tisch beinhaltet einen Probenraum, der über eine Zuleitung mit Inertgas geflutet werden kann. Innerhalb des Probenraums befindet sich eine hermetisch verschließbare Objektkammer (Höhe 200 µm, Volumen 36 µL). Diese besteht aus einem auf eine Glasplatte aufgeschmolzenen Glasring, auf den wiederum ein rundes Deckglas ($\varnothing = 22$ mm) aufgesetzt wird. Hierbei wurde auf die Verwendung jeglicher Form von Klebe- oder Dichtungsmaterialien verzichtet, da diese Substanzen nach Diffusion in die Vesikelmembran die Untersuchungsergebnisse beeinflussen können [95]. Die Temperatur wird innerhalb des Probenraumes über ein Thermoelement (PT-100) kontrolliert. Alle verwendeten Glasmaterialien bestehen aus Quarzglas und sind auch für fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen im UV-Bereich geeignet. Bei der Bestimmung der elastischen Eigenschaften wurde auf die Verwendung hochaperturiger Ölimmersionsobjektive verzichtet, da aufgrund des Probenkontaktes Temperaturgradienten auftreten, die der Einhaltung einer konstanten Temperatur entgegenwirken. Diese können Konvektionen innerhalb der Probe verursachen, die eine präzise Messung beeinträchtigen.

4.7.3 DMPC-Vesikel

Die videomikroskopische Untersuchung der Fluktuationsamplituden von DMPC-Vesikeln erfolgte bei konstanter Temperatur von 30°C ausschließlich an frei im wäßrigen Medium fluktuierenden Vesikel unter Vernachlässigung der Gravitationskraft. Die Vesikel wurden zuvor auf optisch detektierbare Defekte untersucht. Abbildung 4-18 zeigt exemplarisch die Ergebnisse der Fluktuationsanalyse eines DMPC-Vesikels.



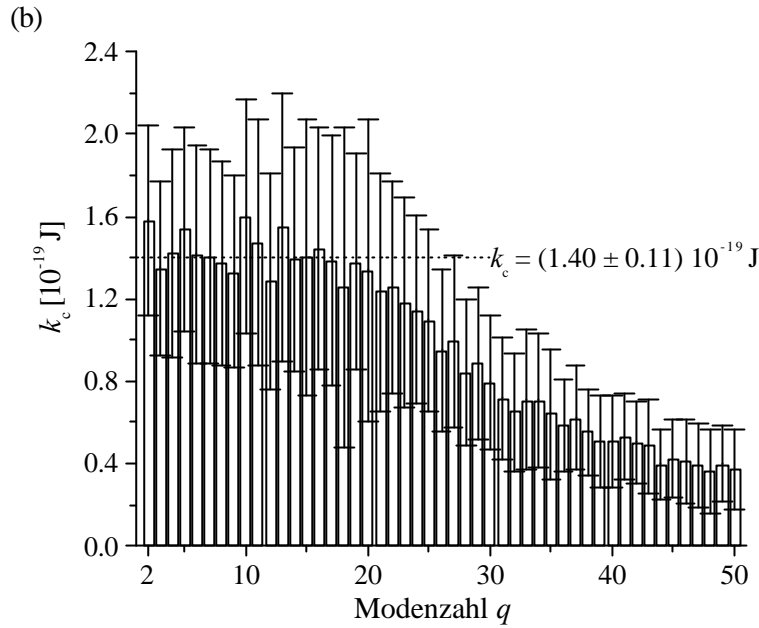


Abbildung 4-18: Ergebnisse der Fluktuationsanalyse von 318 Konturen eines undulierenden DMPC-Vesikels bei konstanter Temperatur von 30.0°C ($r_0 = 16.4 \mu\text{m}$).

(a) U_l vs. $l(l+1)$ Plot zur Bestimmung der Biegesteifigkeit k_c und der effektiven Spannung $\bar{\mathcal{S}}$ nach Gleichung (4.26). Die Biegesteifigkeit kann mittels linearem Fit der Daten mit $l < 22$ zu $k_c = (1.39 \pm 0.06) \cdot 10^{-19} \text{ J}$, sowie die effektive Spannung $\bar{\mathcal{S}} = 2 \pm 1$ ermittelt werden (durchgezogene Linie). Im Bereich $l > 22$ zeigt sich die auflösungsbedingte Abweichung vom linearen Verhalten (gepunktete Linie).

(b) Biegesteifigkeit k_c als Funktion der Wellenzahl q nach Gleichung (4.21) mit $\bar{\mathcal{S}} = 2$. Die Werte von k_c sind bis $q = 20$ unabhängig von der Wellenzahl. Aus diesem Plateaubereich kann ein Modul der Biegesteifigkeit von $k_c = (1.40 \pm 0.11) \cdot 10^{-19} \text{ J}$ ermittelt werden. Der Modenbereich $q > 20$ ist auflösungsdominiert und liefert zu niedrige Werte der Biegesteifigkeit.

Ein Vergleich beider Methoden ergibt eine Biegesteifigkeit k_c von $(1.4 \pm 0.1) \cdot 10^{-19} \text{ J}$.

Die exakte Bestimmung des Moduls der Biegesteifigkeit k_c von Vesikeln eines Phospholipids erfordert die Analyse einer Vielzahl einzelner Vesikel, um zwischen intrinsischen Membraneigenschaften und dem individuellen Verhalten einzelner Vesikel zu unterscheiden. Abbildung 4-19 zeigt das Ergebnis der Untersuchung der Biegesteifigkeit von 37 DMPC-Vesikeln in Form eines Histogramms bei einer konstanten Temperatur von 30°C.

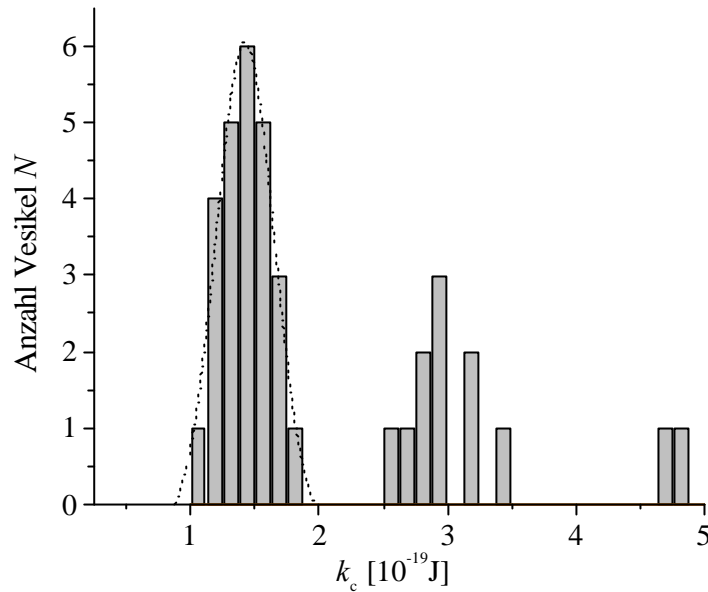


Abbildung 4-19: Histogramm der Häufigkeitsverteilung der ermittelten Biegesteifigkeiten von 37 DMPC-Vesikeln bei $T = (30.0 \pm 0.2)^\circ\text{C}$. Die verschiedenen Gaußverteilungen deuten auf das Vorliegen von Vesikeln mit unterschiedlicher Anzahl an Lamellen hin. Das Maximum der ersten Verteilung liefert mit $k_c = 1.42 \cdot 10^{-19} \text{ J}$ die charakteristische Biegesteifigkeit für das unilamellare System ($n = 1$), das zweite mit $k_c = 2.88 \cdot 10^{-19} \text{ J}$ ($n = 2$) die Biegesteifigkeit für bilamellare Systeme.

Die auffällige Existenz verschiedener Gaußverteilungen mit abnehmender Häufigkeit kann mit dem Vorliegen von Vesikeln unterschiedlicher Lamellenzahl n ($n = 1, 2, \dots$ usw.) begründet werden. Der Modul der Biegesteifigkeit für unilamellare DMPC-Vesikel ($n = 1$) ergibt sich aus dem Maximum der Gaußverteilung mit der kleinsten Biegesteifigkeit ($k_c = (1.42 \pm 0.21) \times 10^{-19} \text{ J}$). Der Biegesteifigkeitsmodul k_c ist für reine Phospholipidvesikel direkt proportional zur Dicke der Vesikelmembran. Aus diesem Grunde deuten die höheren Werte von k_c auf mehrschalige Vesikel ($n > 1$) hin, die ein Vielfaches der Biegesteifigkeit unilamellarer Vesikel liefern. Für mehrschalige Vesikel gilt:

$$k_{c,\text{eff}} = n \cdot k_c \cdot \mathbf{k}, \quad (4.31)$$

wobei $\mathbf{k} \geq 1$ mögliche Interaktionen zwischen den Doppelschichten berücksichtigt. Die Lamellenabstände liegen weit unterhalb des Auflösungsvermögens des Mikroskops und sind auf optischem Wege nicht nachweisbar. Die Multilamellarität kann jedoch mit Hilfe der Fluktuationsanalyse verifiziert werden. Biegesteifigkeiten oberhalb von $k_c = 4 \cdot 10^{-19} \text{ J}$ deuten weiterhin auf Abweichungen von den Gleichgewichtsbedingungen, wie beispielsweise auf Druckunterschiede ($\Delta p \neq 0$) zwischen dem Vesikelinnenraum und der äußeren wässrigen Phase hin.

Diese Vesikel im Bereich erhöhter Biegesteifigkeiten zeigen dementsprechend deutliche Hystereseerscheinungen im Verlauf von k_c bei Variation der Temperatur.

Der Vergleich der ermittelten Biegesteifigkeit für unilamellare DMPC-Vesikel mit Literaturdaten zeigt eine gute Übereinstimmung (Tabelle 4-3). Hierbei ist anzufügen, daß die publizierten Daten stark variieren. Diese Variation ist einerseits auf die unterschiedlichen Präparations- sowie Auswertemethoden zurückzuführen. Ferner führen systematische Fehlerquellen wie der Einfluß von Verunreinigungen des Phospholipids [34] sowie diffusive Einträge von Dichtungsmaterialien [95] zur Bestimmung erniedrigter Biegesteifigkeiten k_c .

Tabelle 4-3: Auflistung einiger publizierter Werte der Biegesteifigkeit k_c unilamellarer DMPC-Vesikel.

Phospholipid	$k_c [10^{-19} \text{ J}]$	$k_c/(kT)$	$T [^\circ\text{C}]$	Literatur
DMPC	1.42 ± 0.21	33.9	30.0	diese Arbeit
DMPC	1.52 ± 0.06	36.7	27.0	[114]
DMPC	1.30 ± 0.09	31.1	30.0	[92]
DMPC	1.1	26.3	30.0	[115]

4.7.4 Einfluß der Acylreste auf die Biegesteifigkeit

Eine Änderung des Biegesteifigkeitsmodul k_c sollte immer dann zu erwarten sein, wenn die intermolekularen Kräfte innerhalb der Doppelschicht verändert werden [114]. Tabelle 4-4 zeigt die ermittelten Werte für DLPC- und DMPC-Vesikel.

Tabelle 4-4: Ermittelte Biegesteifigkeiten bei Variation der Acylreste.

Phospholipid	$k_c [10^{-19} \text{ J}]$	$T [^\circ\text{C}]$
DLPC	0.98 ± 0.15	27
DMPC	1.42 ± 0.21	30

In Übereinstimmung mit Literaturdaten steigt die Biegesteifigkeit fluider Phosphatidylcholinvesikel mit zunehmender Kettenlänge der Acylreste in der Reihenfolge $k_{c(\text{DLPC})} < k_{c(\text{DMPC})} < k_{c(\text{DPPC})}$ [92]. Die Biegesteifigkeit für Membranen einer Komponente folgt im allgemeinen der Beziehung [116]

$$k_c \sim K \cdot \frac{d^n}{a^m}, \quad (4.32)$$

wobei d die Dicke der Phospholipiddoppelschicht, a den molekularen Platzbedarf der Lipide und n und m empirische Exponenten darstellen. Die Konstante K berücksichtigt molekulare Änderungen innerhalb der Doppelschicht.

Membranen ungesättigter Phospholipide zeigen aufgrund des höheren Platzbedarfs und der verminderten Dicke der Doppelschicht eine deutlich erniedrigte Biegesteifigkeit im Vergleich zu gesättigten Lipiden. Dies hat eine wesentliche biologische Konsequenz: Organismen besitzen hierdurch die Möglichkeit, die elastischen Eigenschaften von Zell- oder Organellmembranen durch den Einbau ungesättigter Lipide gezielt variieren zu können.

Für das oben genannte Beispiel der Lecithine kann ferner eine quadratische Abhängigkeit der Biegesteifigkeit von der Dicke des hydrophoben Bereichs der Doppelschicht gefunden werden [92].

4.7.5 Einfluß grenzflächenaktiver Solubilisate auf die Biegesteifigkeit

Neben der Variation der Lipide innerhalb der Doppelschicht verursacht der Einbau grenzflächenaktiver Fremdmoleküle in die Membran eine Variation der Biegesteifigkeit. Eine entsprechende Übersicht der im Rahmen dieser Arbeit ermittelten Biegesteifigkeiten ist in Tabelle 4-5 aufgelistet. Die untersuchten Substanzen weisen größtenteils grenzflächenaktive Eigenschaften auf und haben eine ausgeprägte Affinität zum Kopfgruppenbereich der Phospholipide.

Tabelle 4-5: Einfluß grenzflächenaktiver Solubilisate auf die Biegesteifigkeit von DMPC-Vesikeln bei einer Temperatur von 30°C.

Phospholipid	Solubilisat	Molverhältnis	k_c [10^{-19} J]
DMPC	Myristinsäure	1:1	1.14 ± 0.23
DMPC	Ethanol	1:0.5	0.90 ± 0.08
DMPC	Natriumdodecylsulfat	1:2	0.51 ± 0.05

Das Prinzip der Variation der Biegesteifigkeit von Zellmembranen ist ebenfalls ein in der Natur vielfach beobachtbares Phänomen. Ein populäres Beispiel liefert Cholesterin, ein Regulator der Fluidität der Membran von Eukaryontenzellen. Cholesterin erhöht die Biegesteifigkeit von DMPC-Vesikeln signifikant. Untersuchungen von DMPC-Vesikeln mit einem Anteil von 50 Mol-% Cholesterin zeigen bei $T = 30^\circ\text{C}$ eine Biegesteifigkeit von $k_c = (6.1 \pm 0.3) \cdot 10^{-19}$ J [114]. Dieser Effekt kann auf der Grundlage von Packungsargumenten erklärt werden. Der „ordnende Einfluß“, den Cholesterin auf die unpolaren Ketten des umgebenden Amphiphils ausübt, erniedrigt den Platzbedarf der Lipidmoleküle, da die Acylreste zunehmend ausgestreckt werden. Hierdurch kommt es zu einer verstärkten intermolekularen Wechselwirkung des Amphiphils im lipophilen Bereich der Doppelschicht [106,114]. Desweiteren könnte die Verzahnung der Ketten der gegenüberliegenden Monoschichten und das hierdurch bedingte eingeschränkte gegenseitige Gleiten der Schichten einen Einfluß haben [115,117].

Eine Reduktion der Biegesteifigkeit kann nach Einlagerung von Proteinen oder einer relativ geringer Menge von Oligopeptiden wie dem Ionencarrier Valinomycin [113] beobachtet werden und beruht vermutlich auf einer lokalen Verminderung der Membrandicke. Ein ähnlicher Effekt spielt bei der Solubilisierung von vergleichsweise kurzkettigen Bolalipiden eine Rolle [118,119]. Diese membrandurchspannenden Lipide findet man in Zellmembranen thermophiler Archaeobakterien, die innerhalb ökologischer Nischen bei Temperaturen auch oberhalb von 100°C existieren. Kurzkettige Amphiphile wie mizellbildende Phospholipide, einkettige Tenside oder kurzkettige Alkohole wirken hingegen als eine Art „Spacer“. Im Bereich der Terminierung der kurzkettigen Amphiphile erhöht sich die Freiheit der Acylreste des langkettigen Phospholipids. In diesem Bereich steigt nun der freie Platzbedarf der Acylreste von etwa 0.3 nm² auf etwa 0.4 nm² an, wodurch die zur Biegung benötigte Energie deutlich sinkt [98]. Weiterhin führt der Unterschied des Packungsparameters von Phospholipid und der eingelagerten Substanz vermutlich zu einer Kopplung zwischen der lokalen Krümmung und den eingelagerten Molekülen [57].

Der Einfluß amphiphiler Solubilisate auf die Biegesteifigkeit zeigt eine deutliche Konzentrationsabhängigkeit. Bei Konzentrationen nahe der Lyse der Vesikel können Porenbildungen innerhalb der Membran auftreten. Auf diese Weise kommt es durch Solubilisierung von Natriumcholat zur Bildung hochflexibler Vesikel, den sogenannten Transfersomen™ [8].

4.8 Einfluß lipophiler Solubilisate auf die Biegesteifigkeit

4.8.1 Statische Untersuchungen

Der Einfluß grenzflächenaktiver Substanzen auf die elastischen Eigenschaften von Vesikelmembranen ist recht gut charakterisiert. Über den Einfluß lipophiler, hauptsächlich im unpolaren Bereich lokalisierter Solubilisate ist hingegen sehr wenig bekannt. Einzig Niggemann et al. führten eine Erniedrigung der Biegesteifigkeit während den Untersuchungen auf einen diffusiven Eintrag von Xylol aus dem Dichtungsmaterial der Probenzelle in die Vesikelmembran zurück [95].

Aus diesem Grunde galt es, dieser Fragestellung detailliert nachzugehen. Hierzu wurde der konzentrationsabhängige Einfluß von Toluol auf die Biegesteifigkeit unilamellarer DMPC-Vesikel eingehend untersucht und diese Ergebnisse mit den bereits diskutierten Erkenntnissen auf molekularer Ebene korreliert. Da die Solubilisierungskapazität für kleine aromatische Moleküle in Vesikeln vergleichsweise hoch ist, konnten die Untersuchungen hierzu über einen sehr breiten Konzentrationsbereich erfolgen.

4.8.1.1 Bestimmung des Verteilungskoeffizienten DMPC/Wasser

Die Fluktuationsanalysen erfolgen zur Vermeidung intervesikulärer Wechselwirkungen in verdünnter Lösung. Im Bereich geringer Phospholipidkonzentrationen von $c_{\text{DMPC}} = 1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ist die Wasserlöslichkeit des Toluol jedoch nicht vernachlässigbar. Somit muß durch Bestimmung des molaren Verteilungskoeffizient DMPC/Wasser eine effektive Konzentration von Toluol in der Phospholipiddoppelschicht ermittelt werden (Abbildung 4-20).

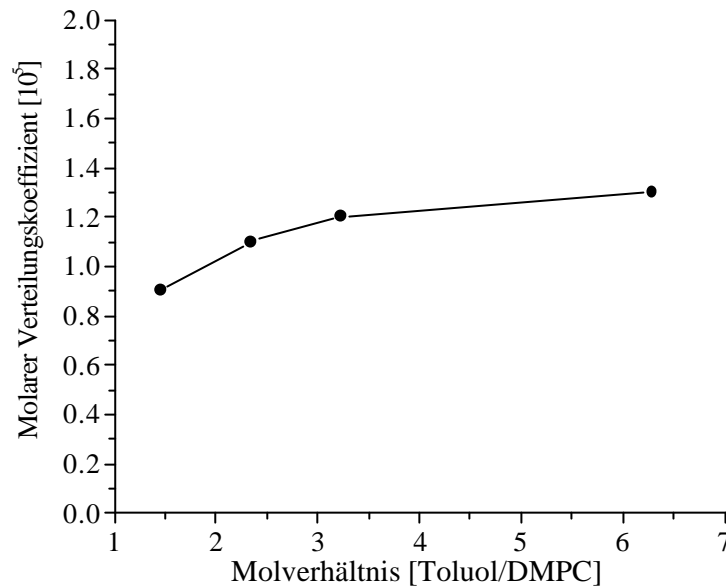


Abbildung 4-20: Abhängigkeit des Verteilungskoeffizienten DMPC/Wasser für Toluol vom Molverhältnis [Toluol/DMPC] bei 30°C. Die Bestimmung erfolgte unter Verwendung der Methode nach Katz und Diamond [120] durch Ermittlung der Toluolkonzentration der wässrigen Phase mit Hilfe der UV/VIS-Spektroskopie nach Abtrennung der Vesikelphase.

Da Vesikel in dieser Größenordnung eine polydisperse Verteilung aufweisen und aus einem Gemisch uni- sowie multilamellarer Strukturen zusammengesetzt sind, kann die bestimmte effektive Konzentration jedoch nur als eine Näherung angesehen werden.

4.8.1.2 Konzentrationsabhängiger Einfluß auf die Biegesteifigkeit

Abbildung 4-21 zeigt den Verlauf der Biegesteifigkeit k_c unilamellarer DMPC-Vesikel als Funktion von solubilisiertem Toluol. Die Einlagerung des lipophilen Solubilisats bewirkt eine signifikante Abnahme von $k_c = (1.42 \pm 0.21) \cdot 10^{-19} \text{ J}$ auf einen Wert von $k_c = (0.36 \pm 0.10) \cdot 10^{-19} \text{ J}$.

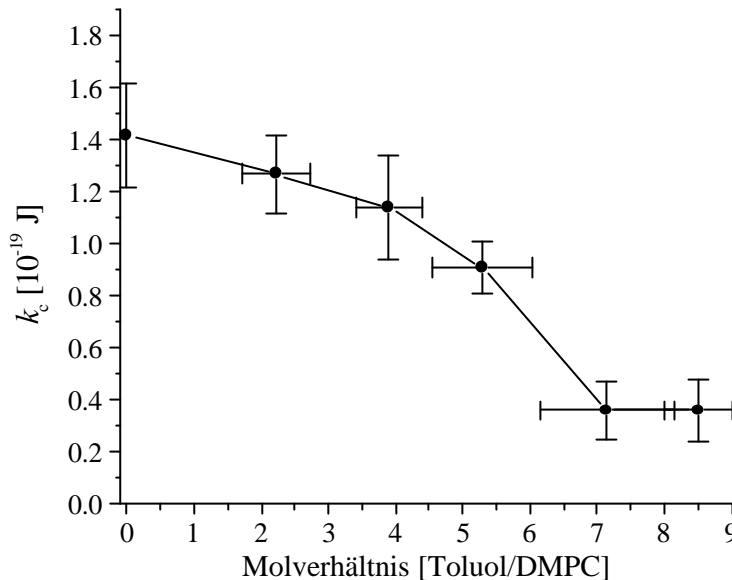


Abbildung 4-21: Einfluß der solubilisierten Toluolmenge auf die Biegesteifigkeit unilamellarer DMPC-Vesikel ($c = 1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) bei 30.0°C . Die Meßpunkte entsprechen Durchschnittswerten von 5 - 15 Vesikeln.

Der konzentrationsabhängige Verlauf der Erniedrigung von k_c kann durch eine Einteilung in drei unterschiedliche Regime charakterisiert werden. Im Bereich kleiner Toluolkonzentrationen zeigt sich eine verhältnismäßig geringe Abhängigkeit von der Solubilisatkonzentration. Dieses ist insofern überraschend, als daß die Biegesteifigkeit hauptsächlich durch den lipophilen Bereich der Doppelschicht dominiert wird [92]. Veränderungen der intermolekularen Wechselwirkungen des Acylbereichs sollten somit einen ausgeprägten Einfluß auf k_c haben. Mit zunehmender Solubilisatmenge sinkt die Biegesteifigkeit deutlich ab und erreicht bei vollständiger Sättigung der Wasserphase mit Toluol einen Plateaubereich. Die Vesikel rahmen in diesem Bereich als Folge der erniedrigten Dichte des binären Gemisches auf.

Gemäß den Ergebnissen der Röntgenbeugung ist insbesondere bei hoher Solubilisatkonzentrationen eine Zunahme der Dicke der Doppelschicht zu erwarten. Eine Erklärung für die Abnahme der Biegesteifigkeit mit steigender Toluolmenge sollte somit nicht einzig auf geometrischen Argumenten gemäß Gleichung (4.32) beruhen. Vielmehr ist eine mögliche Ursache auf molekularer Ebene zu vermuten. Dies soll im folgenden eingehend diskutiert werden.

Toluol wird wie bereits dargelegt in vergleichsweise hoher Konzentration im Membranbereich von DMPC-Vesikeln solubilisiert. Kleine Solubilisatkonzentrationen führen hierbei zu geringfügigen Veränderungen der elastischen Membraneigenschaften. Der lipophile Bereich der fluiden Doppelschicht liefert genügend freies Volumen, um kleine Moleküle ohne nennenswerte Störung der Integrität der Membran einzulagern [39,121]. Die Anisotropie des Acylbereichs bewirkt ferner eine bevorzugte Orientierung des Toluols senkrecht zur Membranebene [122], wobei ein einzelnes Molekül Toluol entlang einer voll ausgestreckten Kette eines DMPC-Moleküls nur etwa 30% der Länge beansprucht. Der Einfluß kleiner Toluolmengen auf die elastischen Eigenschaften ist im Vergleich zu grenzflächenaktiven Substanzen gering und mit einer Erniedrigung der Acyl-Acyl-Wechselwirkung der Amphiphile zu begründen.

Im Bereich steigender Solubilisatkonzentrationen dominieren vermutlich Diffusionsprozesse des Solubilisats das elastische Verhalten der Membran. Im Gegensatz zu polaren Solubilisaten, die im Kopfgruppenbereich der Doppelschicht verankert sind, zeigen lipophile Solubilisate eine um etwa einen Faktor 10 höhere laterale Mobilität [123]. Typische Diffusionskonstanten liegen im Bereich von $D = 1.1 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ für Benzol [123] und $2 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ für Pyren [63]. Neben der lateralen beobachtet man bei lipophilen Solubilisaten ebenfalls eine transversale Diffusion [62]. Eine Kopplung der lokalen Solubilisatkonzentration und der Membrankrümmung wird vielfach im Bereich grenzflächenaktiver Solubilisate diskutiert [57,116,124] und konnte für lipophile Solubilisate in Kapitel 2 und Kapitel 3 bereits gezeigt werden. Diffusionsprozesse des Solubilisats sind schnell im Vergleich zu Krümmungsänderungen der Doppelschicht, wie sie bei der Fluktuation auftreten. Somit kommt es während der Auslenkung der Membran aus der Gleichgewichtslage zu einer verstärkten lateralen Diffusion des Solubilisats in Regionen bevorzugter Packungsbedingungen. Hieraus resultiert letztendlich eine Erniedrigung der Biegesteifigkeit k_c . Moleküle, die im Kopfgruppenbereich verankert sind, zeigen ausschließlich laterale Diffusionsprozesse. Im Falle lipophiler Solubilisate sind jedoch zusätzlich transversale Diffusionsprozesse in Form eines Flip-Flops des Solubilisats zwischen den Monoschichten der Doppelschicht möglich, der Einfluß auf die Biegesteifigkeit kurz erläutert wird.

Die thermisch induzierte Auslenkung der Membran aus der Gleichgewichtslage, wie sie während der Undulation der Membran auftritt, bewirkt lokal eine Änderung der Membrankrümmung. Hierbei erfährt der hydrophobe Bereich der konvexen Monoschicht eine Kompression und analog der unpolare Bereich der konkaven Schicht eine Expansion (vgl. Abbildung 4-22).



Abbildung 4-22: Schematische Darstellung des Spannungseinflusses auf den lipophilen Bereich während der Biegung der Lipiddoppelschicht (Erläuterungen im Text). Der lipophile Bereich der unteren Monoschicht wird bei der Auslenkung aus der Ruhelage expandiert und der obere gleichzeitig komprimiert.

Als Folge dieser hauptsächlich im lipophilen Bereich der Monoschichten lokalisierten Wechselwirkungen resultiert eine elastische Kraft der Membran in Richtung ihrer Ausgangslage. Je größer somit die Wechselwirkungen der Acylreste ist desto größer wird die resultierende Biegesteifigkeit der Membran und umgekehrt. Die Einlagerung eines frei beweglichen Moleküls innerhalb des lipophilen Membranbereichs führt zu einer Reduktion lokaler Dichtefluktuationen während der Undulation der Membran. Bei der Auslenkung der Membran kommt es zu einer bevorzugten Diffusion der lipophilen Moleküle aus den komprimierten in die expandierten Bereiche. Diese Diffusion ist sowohl lateral, als auch in Form eines Austausches zwischen den einzelnen Monoschichten möglich. Dies führt zu einer Verstärkung der Amplituden der Fluktuation der Membran und zur Erniedrigung der Biegesteifigkeit k_c .

Ein weiterer Einfluß, die in Kapitel 3 diskutierte Segregation ist vermutlich im Bereich steigender Solubilisatkonzentrationen zu beobachten. Innerhalb der Doppelschicht koexistieren zwei fluide lamellare Phasen, eine toluolreiche und eine toluolarme in Abhängigkeit von der Temperatur und Toluolmenge. Die Existenz eines biphasigen Gleichgewichts wird als eine mögliche Erklärung für Veränderungen der mechanischen Eigenschaften von Vesikelmembranen diskutiert [114]. Dies führt innerhalb der Doppelschicht zu Fluktuationen der lokalen Zusammensetzung. Effekte dieser Art haben großen Einfluß auf die Kompressibilität von Zwei-Komponenten-Gemischen [125] und können vermutlich eine Erniedrigung der Biegesteifigkeit bewirken [126,127].

Die Existenz eines Plateaus von k_c im Bereich von Toluolkonzentrationen nahe der maximalen Solubilisierungskapazität der Membran deutet auf ein Minimum der Amphiphilwechselwirkung zugunsten von Acyl-Toluol-Interaktionen hin. Dieser Einfluß entspricht Beobachtungen im System DSPC/Benzol [39]. Die mit Hilfe der Röntgenbeugung beobachtete Zunahme der Membrandicke unterstreicht die Interkalation zwischen den Monoschichten, so daß auch mögliche Verzahnungen der Schichten vollständig aufgehoben werden.

4.8.2 Phasenseparationen im System Toluol/DMPC

Toluolkonzentrationen nahe der Sättigungsgrenze der Doppelschicht führen zu visualisierbaren Defekten im Membranbereich, die als Domänen von Toluol im Membranbereich als Folge einer Phasenseparation identifiziert werden konnten (Abbildung 4-23). Hierdurch bedingt ist ein erneuter Anstieg der Biegesteifigkeit k_c detektierbar (Daten nicht in Abbildung 4-21 enthalten). Interessanterweise sind die Domänen trotz der zu erwartenden Linienspannung stabil.

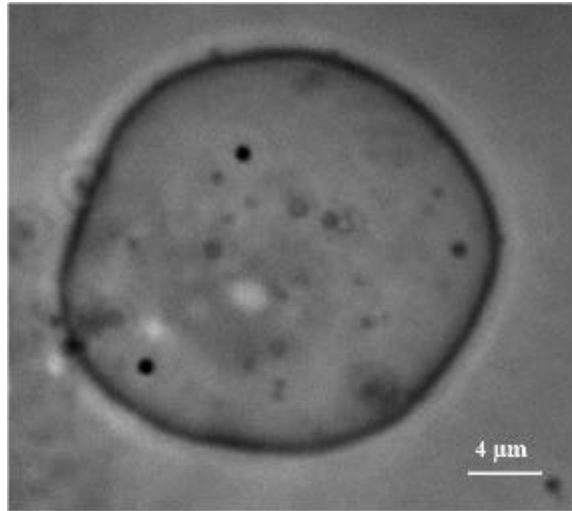


Abbildung 4-23: Bild eines fluktuierenden Vesikels mit einer Toluolkonzentration nahe der maximalen Solubilisierungskapazität. Die dunklen punktförmigen Bereiche befinden sich auf der Vesikeloberfläche. Hierbei handelt es sich um Anreicherungen des Solubilisats im Membranbereich. Die Domänen weisen Durchmesser von etwa 800 nm auf und sind über den Beobachtungszeitraum einiger Stunden stabil. Eine Fluktuationsanalyse des Vesikels liefert eine Biegesteifigkeit von $k_c = 1.0 \cdot 10^{-19}$ J.

Toluolkonzentrationen oberhalb der Solubilisierungskapazität der fluiden Vesikel führen zur Koexistenz von Emulsionstropfen mit sphärischen Vesikeln. Die Vesikel weisen analog den Beobachtungen unter Verwendung der DPPC-Vesikel phasensepariertes Toluol auf (Abbildung 4-24).

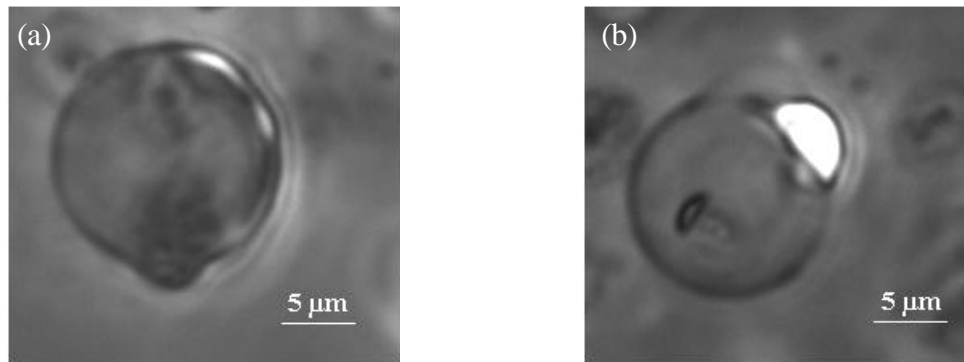


Abbildung 4-24: DMPC-Vesikel im Bereich maximaler Solubilisierungskapazität. Ein Teil des Membranbereichs ist durch die Separation von Toluol (heller Bereich) deutlich verbreitert (a), bzw. Toluol ist tropfenförmig im Membranbereich eingelagert (b). Die Vesikel weisen keinerlei Überschußfläche auf und zeigen somit keine thermisch angeregten Undulationen. Die Krümmungsradien sind im Bereich der Toluoleinlagerung leicht erniedrigt.

Die Segregation erfolgt unter Separation der beiden Monoschichten und Ausweichen von Toluol in die dritte Dimension. Um den ungünstigen Toluol/Wasser-Kontakt zu minimieren, diffundieren vermutlich verstärkt Phospholipidmoleküle zur Grenzfläche. Hierdurch wird die Überschußfläche des Vesikels stark reduziert, so daß thermisch bedingte Undulationen in der Folge nicht mehr beobachtbar sind.

Derartige visualisierbare Phasenseparationen konnten für den Bereich der BTX-Aromaten als lipophile Solubilisate nachgewiesen werden. Hierbei zeigte sich keinerlei Abhängigkeit von der Kettenlänge der Acylreste des Lecithins.

4.9 Temperaturabhängige Formfluktuationsanalyse

4.9.1 Thermoelastische Eigenschaften

Da der Biegesteifigkeitsmodul k_c von Phospholipidvesikeln in der L_α -Phase wesentlich durch Wechselwirkungen des hydrophoben Bereichs des Bilayers geprägt wird [92], ist ferner ein temperaturabhängiges Verhalten zu erwarten. Mit steigender Temperatur steigt die Anzahl möglicher Rotationsisomere im Acylbereich der Doppelschicht. Hierdurch nimmt die Länge l_c sowie resultierend die van-der-Waals-Wechselwirkungen der Acylketten ab. Gleichzeitig steigt die Membranfläche an, während die Dicke der Doppelschicht und die Biegesteifigkeit sinken.

Die Untersuchungen des thermotropen Verhaltens wurden unter Bedingungen unendlicher Verdünnung an einzelnen Vesikeln durchgeführt. Abbildung 4-25 zeigt den experimentell ermittelten Verlauf des Biegesteifigkeitsmoduls k_c eines DMPC-Vesikels als Funktion der Temperatur.

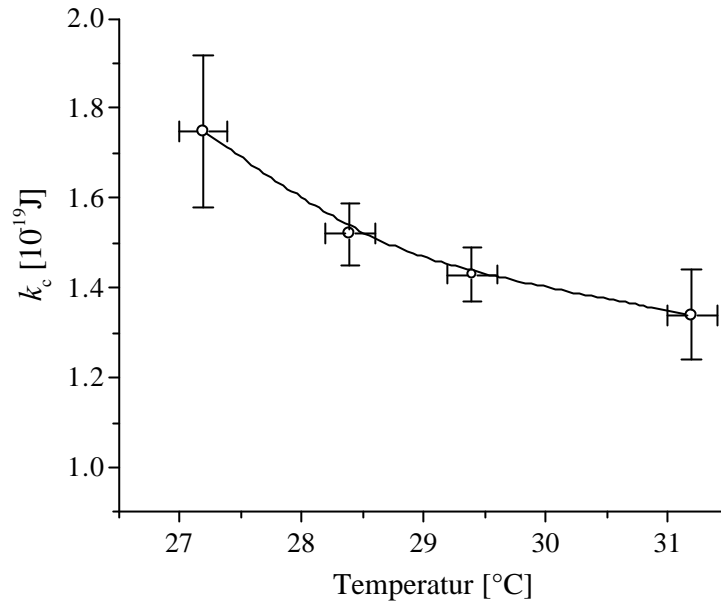


Abbildung 4-25: Temperaturabhängiger Verlauf der Biegesteifigkeit k_c eines DMPC-Vesikels. Die experimentell ermittelten Werte wurden durch Fluktuationsanalyse eines einzelnen Vesikels durch Variation der Temperatur erhalten.

Bei Annäherung der Temperatur der Phasenumwandlung ($T_m = 24^\circ\text{C}$) ist eine deutlich erhöhte Biegesteifigkeit zu erkennen. Hier werden Anomalien im elastischen Verhalten der Membran beobachtbar, die den Bereich $T < T_m + 3^\circ\text{C}$ dominieren und eine Folge der Phasenumwandlungen sind [92].

Da die Spannung der Membran ebenfalls temperaturabhängig ist, wurden vergleichende Untersuchungen der Temperaturabhängigkeit der Biegesteifigkeit an Vesikeln mit nahezu identischen effektiven Spannungen \bar{S} durchgeführt. Abbildung 4-26 zeigt zum Vergleich die Temperaturabhängigkeit der Biegesteifigkeit eines toluolbeladenen DMPC-Vesikels.

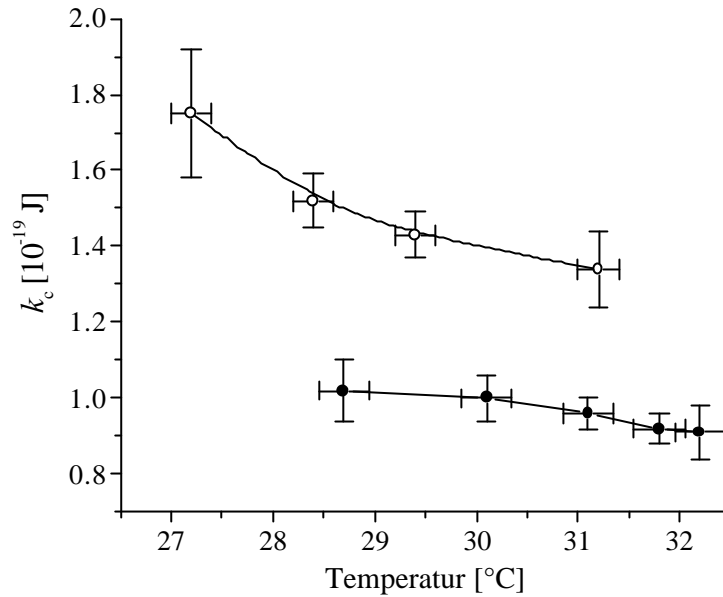


Abbildung 4-26: Einfluß der Temperatur auf die Biegesteifigkeit k_c unilamellarer Vesikel. Die Grafik zeigt im Vergleich den Verlauf eines DMPC-Vesikels (—○—) sowie eines DMPC-Vesikels mit solubilisiertem Toluol (85 Mol-%) nahe der maximalen Solubilisierungskapazität der Membran (—●—).

Die thermische Abhängigkeit der Biegesteifigkeit wird durch das Solubilisat deutlich beeinflusst. So zeigt sich im Temperaturbereich von 29°C bis 31°C eine um den Faktor zwei höhere Abnahme von k_c mit steigender Temperatur bei Abwesenheit des lipophilen Solubilisats. Die Abnahme der Biegesteifigkeit bei Erhöhung der Temperatur ist eine Folge der Bildung von Rotationsisomeren und der hierdurch bedingten verminderten van-der-Waals-Wechselwirkung der Acylreste im lipophilen Bereich der Doppelschicht. Unter dem Einfluß des lipophilen Solubilisats ist eine temperaturbedingte Bildung von Rotationsisomeren bei nahezu solubilisatgesättigter Doppelschicht entsprechend klein.

4.9.2 Isobarer thermischer Flächenausdehnungskoeffizient b

Die thermisch bedingte Ausdehnung von Wasser ist im Vergleich der einer Lipiddoppelschicht klein. Dieses hat zur Folge, daß bei einer Temperaturerhöhung die Membranfläche A zunimmt, während das innere Volumen V nahezu konstant bleibt. Folglich sinkt das reduzierte Volumen und die Gestalt des Vesikels ändert sich. So erfolgt ausgehend von einer Kugel bei Erhöhung der Temperatur eine Formänderung in eine ellipsoide Gestalt.

Das thermische Verhalten wird durch den jeweiligen Ausdehnungskoeffizienten beschrieben. Im Gegensatz zu homogenen, isotropen Flüssigkeiten, bei denen der Flächen- und der Volumenausdehnungskoeffizient proportional sind, zeigt die thermische Ausdehnung von Lipiddoppelschichten ein anisotropes Verhalten.

Die Volumenausdehnung g_v folgt aus der Summe $g_v = b + b_\perp$, des Flächenausdehnungskoeffizienten b und des Ausdehnungskoeffizienten des Membranquerschnitts b_\perp . Die thermisch bedingte laterale Ausdehnung der Membran bei einer Erhöhung der Temperatur ist im allgemeinen mit der gleichzeitigen Dickenabnahme verbunden.

Der isobare thermische Flächenausdehnungskoeffizient b einzelner unilamellarer Vesikel kann mit Hilfe der Videomikroskopie aus der temperaturabhängigen Änderung der Vesikelfläche ermittelt werden. Zur Charakterisierung des Einflusses eines lipophilen Solubilisats auf den Wert von b erfolgte die Bestimmung unter Verwendung einzelner DMPC-Vesikel sowie DMPC-Vesikel nach Solubilisierung von Toluol (85 Mol-%) im lipophilen Bereich der Doppelschicht. Hierzu wurden ausschließlich Vesikel mit etwa identischer effektiver Spannung verglichen.

Der Flächenausdehnungskoeffizient b wird definiert als

$$b = \frac{1}{A_0} \cdot \left(\frac{\partial A}{\partial T} \right)_p \quad (4.33)$$

und kann bei bekannter Temperaturabhängigkeit der Biegesteifigkeit sowie der effektiven Spannung (Abbildung 4-27) durch Ermittlung der Überschußfläche Δ gemäß Gleichung (4.17) ermittelt werden.

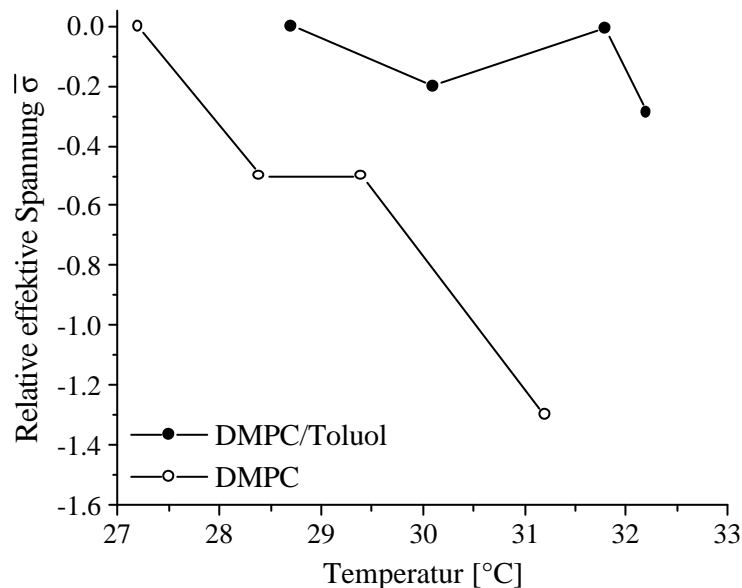


Abbildung 4-27: Temperaturabhängige Abnahme der effektiven Spannung (bezogen auf die Ausgangswerte bei niedriger Temperatur) eines unilamellaren DMPC-Vesikels (—○—) und eines DMPC-Vesikels nach Solubilisierung von Toluol (—●—).

Der Flächenausdehnungskoeffizient b folgt aus der Temperaturabhängigkeit der Überschußfläche gemäß [113]

$$\Delta(T) = b \cdot (T - T_0) \quad (4.34)$$

und kann unter der Annahme einer nahezu linearen Abhängigkeit nach Abbildung 4-28 ermittelt werden. T_0 bezeichnet hierbei die Temperatur, bei der formal jegliche Überschußfläche verschwunden ist ($\Delta = 0$) und thermisch angeregte Fluktuationen nicht mehr beobachtet werden.

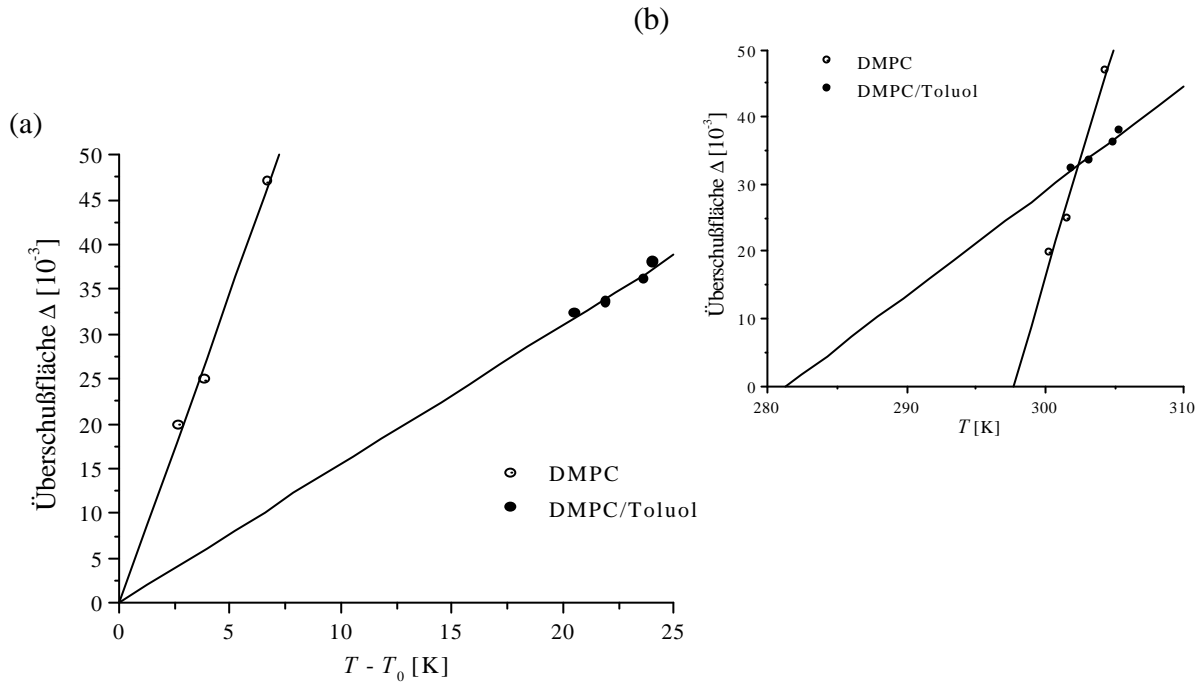


Abbildung 4-28: (a) Verlauf der Überschußfläche als Funktion der reduzierten Temperatur ($T - T_0$) zur Ermittlung des thermischen Flächenausdehnungskoeffizienten b nach Gleichung (4.34). Die Temperatur T_0 ergibt sich aus dem Abszissenschnittpunkt der Auftragung Δ vs. T (b).

Tabelle 4-6: Vergleich der ermittelten thermischen Ausdehnungskoeffizienten b sowie der Temperatur T_0 unilamellarer Vesikel.

	T_0 [°C]	b [10^{-3} K^{-1}]
DMPC	24.5	6.9 ± 0.8
DMPC/Toluol (85 Mol-%)	8.2	1.6 ± 0.3

Der ermittelte Flächenausdehnungskoeffizient b von DMPC zeigt eine gute Übereinstimmung mit Literaturwerten. Diese liegen im Bereich von $6.8 \cdot 10^{-3} \text{ K}^{-1}$ (29°C) [96] und $10.4 \cdot 10^{-3} \text{ K}^{-1}$ (24°C) [113]. Unter dem Einfluß von Toluol bei Konzentrationen nahe der maximalen Solubilisierungskapazität erfolgt eine deutliche Erniedrigung von b und T_0 in

Richtung des Ausdehnungskoeffizienten von Toluol. Die Reduktion von b ist vergleichbar mit der nach Einlagerung von Cholesterin in die Membran von DMPC-Vesikeln (50 Mol-%) mit $b = 1.3 \cdot 10^{-3} \text{ K}^{-1}$ unter gleichzeitiger Erniedrigung der Kompressibilität der Membranfläche [96,128].

Die reduzierte thermische Ausdehnung der Doppelschicht nach Solubilisierung von Toluol ist vermutlich eine Folge des Auftretens von Grenzflächenspannungen. Die thermisch bedingte laterale Ausdehnung führt im Bereich der Kopfgruppe zu einem erhöhten Platzbedarf und zu einem Kontakt des lipophilen Bereichs mit der wässrigen Phase. In Anwesenheit eines lipophilen Solubilisats geschieht dies bei vergleichbar kleinerer Temperaturerhöhung und führt zu einer erhöhten Grenzflächenspannung im Bereich der Öl/Wasser-Grenzfläche. Die Grenzflächenspannung wirkt bei einer Temperaturerhöhung somit der lateralen Ausdehnung bedingt durch die Ausbildung von Rotationsisomeren entgegen.

4.9.3 Aktivierungsenergie der Biegsamkeit

Mit Hilfe eines Arrhenius-Diagramms kann eine scheinbare Aktivierungsenergie E_0 der Biegsamkeit, d.h. der inversen Biegesteifigkeit der Membran gemäß [95]:

$$k_c = k_{c,0} \cdot e^{\left(\frac{E_0}{k \cdot T}\right)} \quad (4.35)$$

durch lineare Anpassung nach Auftragung von $\ln k_c$ vs. T^{-1} ermittelt werden (Abbildung 4-29). Der Vergleich der Daten in Tabelle 4-7 für DMPC-Vesikel zeigt eine deutliche erniedrigte Aktivierungsenergie bei Anwesenheit eines lipophilen Solubilisats.

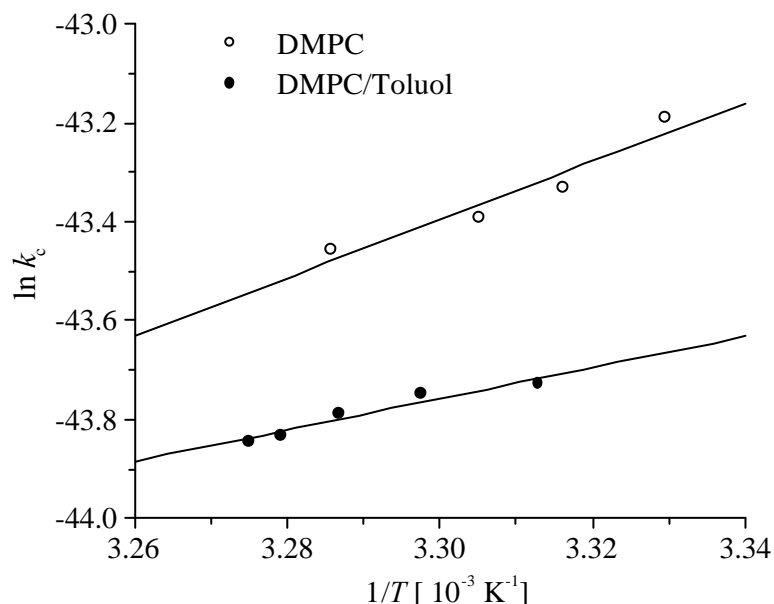


Abbildung 4-29: Arrhenius-Diagramm zur Bestimmung der Aktivierungsenergie E_0 der Biegsamkeit (inversen Biegesteifigkeit).

Tabelle 4-7: Aktivierungsenergie der Biegsamkeit (Flexibilität) unilamellarer Vesikel verschiedener Zusammensetzung.

Zusammensetzung	E_0 [10^{-19} J]	Literatur
DMPC	1.16 ± 0.20	diese Arbeit
DMPC/Toluol (85 Mol-%)	0.60 ± 0.16	diese Arbeit
DOPC	0.98 ± 0.16	[95]

4.10 Zusammenfassung

Die Fluktuationsanalyse erlaubt die nicht-invasive Ermittlung der Biegesteifigkeit k_c einzelner unilamellarer Vesikel auf der Basis der Videomikroskopie. Die Biegesteifigkeit unilamellarer DMPC-Vesikel bei 30°C liefert in Übereinstimmung mit Literaturdaten einen Wert von $k_c = (1.42 \pm 0.21) \cdot 10^{-19}$ J, der mit steigender Temperatur sinkt.

Der Einfluß grenzflächenaktiver Solubilisate wie Natriumdodecylsulfat oder Ethanol führt zu einer Erniedrigung von k_c . Die Solubilisierung von Toluol im lipophilen Bereich der Doppelschicht von DMPC-Vesikel bewirkt ebenfalls eine Reduktion der Biegesteifigkeit bis $k_c = (0.36 \pm 0.10) \cdot 10^{-19}$ J. Diese ist konzentrationsabhängig und kann mit der hohen Beweglichkeit des Solubilisats begründet werden. Ferner haben Inhomogenitäten in der Zusammensetzung von Solubilisat und Amphiphil im Bereich hoher Solubilisatkonzentrationen einen Einfluß auf die Biegesteifigkeit. Unter dem Einfluß von Toluol sinkt der thermische Ausdehnungskoeffizient der Membran von DMPC-Vesikeln von $(6.9 \pm 0.8) \cdot 10^{-3} \text{ K}^{-1}$ auf $(1.6 \pm 0.3) \cdot 10^{-3} \text{ K}^{-1}$, ein Effekt, der auf erhöhte Grenzflächenspannungen hindeutet. Das Auftreten von mikroskopisch nachweisbaren Toluoldomänen innerhalb der Membran im Bereich der maximalen Solubilisierungskapazität ist eine Folge einer Phasenseparation und führt zu einem anomalen Verhalten der Biegesteifigkeit k_c , die in der Folge ansteigt. Eine weitere Erhöhung der Solubilisatkonzentration führt zur Aggregation einzelner Cluster unter deutlicher Dickenzunahme der Membran. Dieses Ausweichen in die dritte Dimension erfolgt jedoch auf Kosten der Überschußfläche Δ , so daß Vesikel im Bereich maximaler Solubilisierungskapazität keine Überschußfläche aufweisen.

4.11 Bedeutung der Biegesteifigkeit von Vesikeln

Neben der bereits diskutierten Bedeutung der Biegesteifigkeit von Amphiphilfilmen an Grenzflächen, spielt k_c vermutlich auch eine entscheidende Rolle bei Solubilisierungsprozessen von Vesikeln, ein Punkt, der im folgenden Kapitel näher erläutert wird. Die Biegesteifigkeit hat ebenfalls Einfluß auf das Verhalten von Vesikeln im Bereich poröser Materialien und bei der Annäherung von Vesikeln an feste Grenzflächen.

4.11.1 Permeation flexibler Phospholipidvesikel in mikroporösen Materialien

Untersuchungen des Permeationsverhaltens von Vesikeln im Bereich artifizierter sowie biologischer Barrieren wie der menschlichen Haut konnten zeigen, daß die Permeabilität von Vesikeln neben dem Verhältnis von Poren- zu Vesikelgröße (r_p bzw. r_v) sehr stark von der Biegesteifigkeit k_c abhängt. Nach Cevc [8] gilt für die Permeationsrate j von Vesikeln durch eine, im Vergleich zum Vesikelradius, kleinere Pore aufgrund eines Druckgefälles Δp die genäherte Beziehung

$$j \sim \frac{kT}{k_c} \left(\frac{r_p}{r_v} \right)^2 \Delta p. \quad (4.36)$$

Die Zugabe von Natriumcholat zu Phospholipidvesikeln führt zur einer deutlichen Erniedrigung der Biegesteifigkeit und zur Bildung sogenannter Transfersomen, die selbst bei einem Verhältnis $r_v/r_p \geq 0.25$ Permeationsraten zeigen, die weitaus größer als diejenigen unbeladener Vesikel sind und im Bereich mizellarer Lösungen ($r_m/r_p \approx 60$) liegen.

Mikroskopische Untersuchungen der Permeation riesiger fluider DMPC-Vesikel durch ein poröses Material bestehend aus Quarzpartikeln bestätigen den Durchtritt durch vergleichsweise kleine Poren (Abbildung 4-30). Liegen die Vesikel im Gelzustand vor, so kann eine Permeation im Falle von $r_v > r_p$ nicht beobachtet werden.

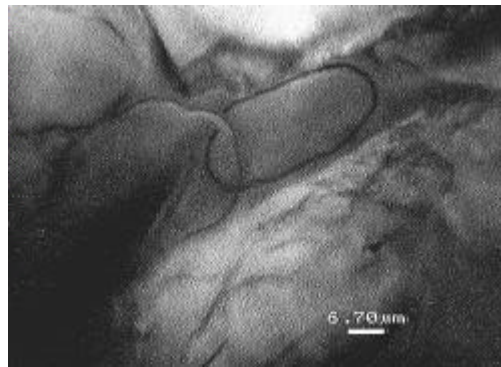


Abbildung 4-30: Permeation einer Reihe fluider DMPC-Vesikel aufgrund eines Druckgradienten durch einen engen Porenbereich bestehend aus diffusen Quarzpartikeln. Die Vesikel werden beim Eintritt in die vergleichsweise kleine Pore in eine elliptische Form deformiert. Auf diese Weise ist ein Durchdringen der Pore möglich, obwohl der Vesikelradius größer ist als der Porenradius.

4.11.2 Undulationskräfte bei Annäherung von Vesikeln an feste Grenzflächen

Die Biegesteifigkeit fluider Membranen ist verantwortlich für fluktuationsbedingte Wechselwirkungen von Vesikeln mit festen Grenzflächen. Thermische bedingte Fluktuationen relaxierter Vesikel führen zu einer dynamischen Oberflächenrauigkeit der Vesikel-

membran. Mit Annäherung an eine feste Grenzfläche werden die Moden mit größerer Wellenlänge nach und nach unterdrückt. Hieraus resultiert eine repulsive, entropische Kraft, die mit Annäherung an die Oberfläche ansteigt. Mit dem Abstand des Vesikels d_w von der Oberfläche gilt [129]

$$E_{\text{Und}} = \frac{3p^2}{128} \frac{(kT)^2}{k_c} \frac{1}{d_w^2}. \quad (4.37)$$

Die mittleren quadratischen Amplituden der Fluktuationen stehen in direktem Zusammenhang mit dem Quadrat des mittleren Abstandes d_w [130]

$$\langle u^2 \rangle \approx d_w^2.$$

Die Undulationskräfte liegen für DMPC-Vesikel mit der Dicke d_l der Doppelschicht in der gleichen Größenordnung wie die anziehenden van-der-Waals-Wechselwirkungen gemäß

$$E_{\text{vdW}} = \frac{A_H}{12p} \left(\frac{1}{d_w^2} + \frac{1}{(d_w + 2d_l)^2} - \frac{2}{(d_w + d_l)^2} \right) \quad (4.38)$$

wobei A_H die Hamaker Konstante bezeichnet ($A_H = 1 - 6 \cdot 10^{-21} \text{ J}$ [129]).

Falls die Biegesteifigkeit k_c klein gegen kT ist, können Undulationskräfte die Wechselwirkung dominieren. Ferner minimieren sich die Undulationskräfte, falls die Membranspannung z.B. aufgrund osmotischer Effekte steigt. Hierdurch werden die Amplituden der Undulation erniedrigt.

5 Kinetische Untersuchungen zur Solubilisierung

In den vorangehenden Abschnitten konnte gezeigt werden, inwieweit die physiko-chemischen und die mechanischen Eigenschaften von Vesikeln vom Verhältnis Amphiphil und lipophilem Solubilisat abhängen. Die Untersuchungen erfolgten im wesentlichen unter Gleichgewichtsbedingungen. Im folgenden soll der Schwerpunkt auf Nichtgleichgewichtsbedingungen gelegt werden, die für zahlreiche technische Anwendungen von Bedeutung sind. Die Kenntnis der Kinetik der Solubilisierung beispielsweise ist bei bekanntem Solubilisationsvermögen für eine Vielzahl von Waschprozessen [131], der tertiären Erdölförderung [12] bis hin zu Problemen der Sanierung kontaminierter Böden [13] essentiell.

Die Untersuchungen beruhen auf videomikroskopischen Methoden und gliedern sich in zwei Bereiche. Im ersten erfolgt die Untersuchung der Dynamik des Einbaus lipophiler Solubilisate in einzelne unilamellare Vesikel und die Analyse der damit verbundenen strukturellen Veränderungen des Assoziationskolloids aufgrund des diffusiv eingetragenen lipophilen Solubilisats. Im zweiten Bereich wird der Fokus auf die eigentliche Solubilisierung im Sinne der Erhöhung der Löslichkeit schwer- oder unlöslicher Substanzen gelegt. Hierzu erfolgten Untersuchungen der Solubilisierungsrate von wasserunlöslichen Ölen in einem Überschuß einer homogenen Vesikeldispersion. In beiden Teilen wurden ausschließlich passive, d.h. auf der Brown'schen Molekularbewegung beruhende Transportprozesse betrachtet.

5.1 Dynamik des Einbaus lipophiler Solubilisate in die Vesikelmembran

Die Untersuchung der Dynamik des Einbaus lipophiler Solubilisate in die Doppelschicht einzelner unilamellarer Vesikel erfolgte in Form von Diffusionsexperimenten unter Verwendung von Toluol als lipophilem Solubilisat. Die noch signifikante Wasserlöslichkeit von Toluol ($515 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; 20°C [132]) erlaubt den diffusiven Transport über die Wasserphase in den lipophilen Doppelschichtbereich von Vesikeln in einem für die Beobachtung angemessenen Zeitrahmen. Die mikroskopischen Untersuchungen wurden in einer in Abbildung 5-1 dargestellten, geschlossenen Küvette unter Verwendung einzelner, zunächst unbelasteter DMPC-Vesikel über einen Zeitraum von mehreren Stunden durchgeführt.

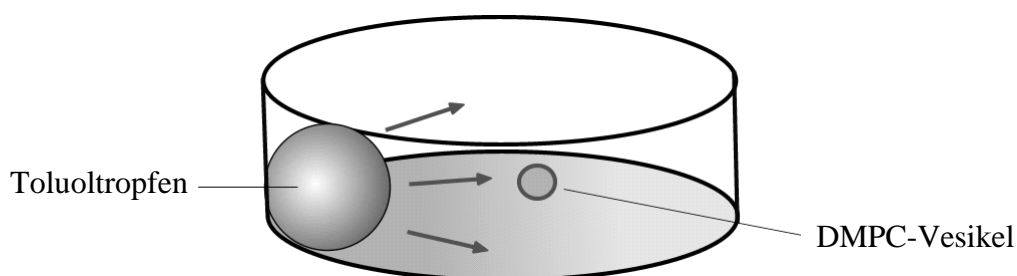


Abbildung 5-1: Schematische Versuchsanordnung des Diffusionsexperimentes. Die dargestellte Mikroküvette enthält eine verdünnte wässrige Vesikeldispersion ($c = 1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$), in die ein Toluoltropfen eingebracht wird. Anschließend wird der diffusive Eintrag in ein einzelnes unilamellares DMPC-Vesikel mikroskopisch als Funktion der Beobachtungszeit analysiert.

Mit Methoden der digitalen Bildverarbeitung ist eine zeitgleiche Analyse der elastischen Konstanten k_c und \bar{s} sowie geometrischer Parameter wie der Vesikelfläche A , der Überschußfläche Δ und des Äquivalentradius r_0 möglich. Weiterhin wurden visualisierbare strukturelle Veränderungen im Membranbereich der Vesikel untersucht. Der typische Verlauf des Moduls der Biegesteifigkeit k_c eines einzelnen Vesikels ist als Funktion der Beobachtungszeit in Abbildung 5-2 dargestellt. Die deutliche Abnahme von k_c zeigt unter Berücksichtigung der Ergebnisse der statischen Experimente aus Kapitel 4, daß ein diffusiver Eintrag von Toluol in den Membranbereich erfolgt ist. Nach etwa zwei Stunden wird ein Plateauwert erreicht. Der zeitliche Verlauf beruht im wesentlichen auf der Diffusionsgeschwindigkeit von Toluol in Wasser ($D = 0.92 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ [133]).

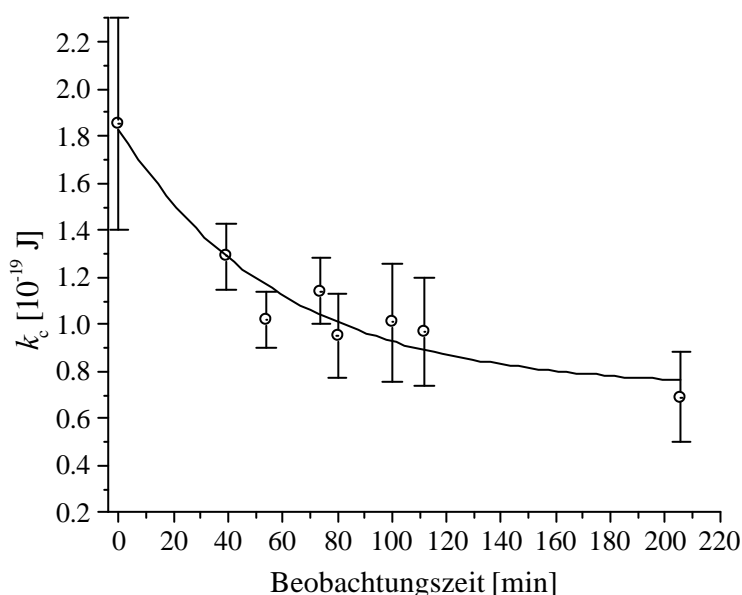


Abbildung 5-2: Zeitliche Abnahme der Biegesteifigkeit k_c durch Diffusion von Toluol in den lipophilen Membranbereich eines riesigen unilamellaren DMPC-Vesikels bei konstanter Temperatur von $31.5 \pm 0.2^\circ\text{C}$. Die Biegesteifigkeit zur Zeit $t < 0$ entspricht der zum Zeitpunkt $t = 0$. Die jeweilige Meßzeit betrug etwa 3 Minuten pro Meßpunkt.

Die Analyse der Vesikelgeometrie während des Diffusionsprozesses zeigt, daß der äquivalente Radius r_0 einer entsprechenden Sphäre gleichen Volumens V im Beobachtungszeitraum im Rahmen des Meßfehlers mit $r_0 = 9.5 \pm 0.1 \text{ } \mu\text{m}$ konstant bleibt. Gemäß

$$V = \frac{4}{3}\pi r_0^3 \quad (5.1)$$

ist somit eine Volumenkonstanz des Vesikels gewährleistet. Hierbei ist anzumerken, daß dennoch eine Diffusion von Toluol in das innere wäßrige Vesikelvolumen zu erwarten ist. Die entsprechende Volumenänderung ist jedoch klein und mit der hier vorgestellten Methodik nicht auflösbar. Die Permeation lipophiler Substanzen durch die Lipiddoppelschicht ist ein vergleichsweise schneller Prozeß. Entsprechend sollten sich auftretende Konzentrationsgradienten von Toluol zwischen der äußeren Bulkphase und dem inneren Vesikelvolumen unverzüglich ausgleichen. Ein Einfluß osmotischer Effekte sowie ein resultierendes Druckgefälle zwischen dem Vesikelinneren und der äußeren Phase kann somit vernachlässigt werden, so daß der zeitliche Verlauf der Biegesteifigkeit vermutlich einzig auf der Solubilisierung von Toluol beruht.

Neben der Volumenkonstanz ist ein deutlicher Anstieg der Vesikelfläche A um $\Delta A / A \approx 10 \text{ } \%$ mit steigender Diffusionszeit und eine hierdurch bedingte zunehmende Entfernung von der Geometrie einer Sphäre zu beobachten. Letzteres spiegelt sich ebenfalls im Abfall der effektiven Spannung $\bar{\sigma}$ (vgl. Abbildung 5-3) wieder.

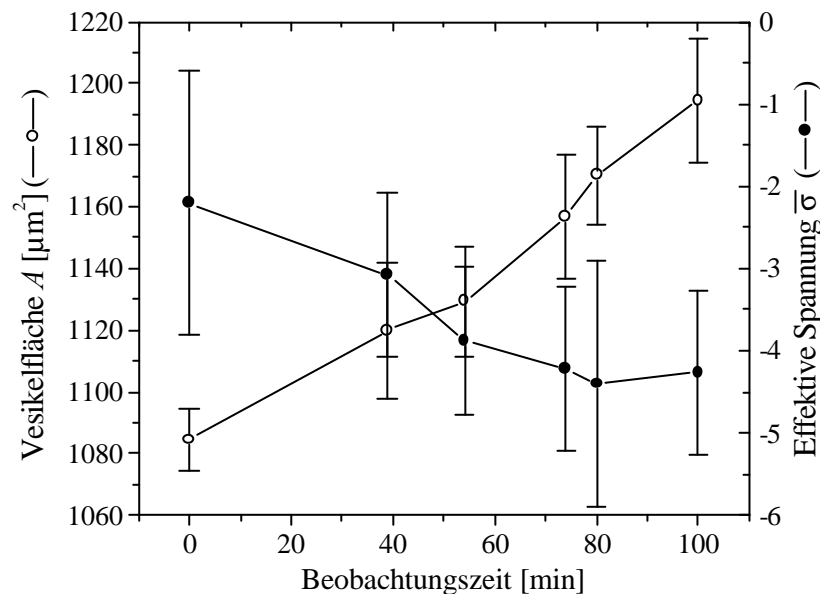


Abbildung 5-3: Änderung der Vesikelfläche A und der effektiven Spannung $\bar{\sigma}$ eines unilamellaren DMPC-Vesikels durch Diffusion von Toluol in den lipophilen Bereich der Doppelschicht.

Der Flächenzuwachs ΔA ist letztendlich eine Folge der Einlagerung von Toluol in den lipophilen Bereich der Doppelschicht. Diesbezüglich stellt sich jedoch die Frage, ob die Solubilisierung einzig auf der beobachteten lateralen Ausdehnung der Membran beruht oder ein dreidimensionales Problem unter gleichzeitiger Variation der Dicke der Doppelschicht darstellt. Da entsprechende Dickenänderungen der Membran weit unterhalb des Auflösungsvermögens der verwendeten Methode liegen, kann ein Nachweis nur auf indirektem Wege erfolgen. Hierzu wird zunächst eine Abschätzung der maximal solubilisierbaren Toluolmenge entsprechend dem Flächenzuwachs ΔA unter Annahme einer konstanten Dicke d der Doppelschicht von 3.5 nm während des gesamten Solubilisierungsprozesses vorgenommen. Das maximal verfügbare Membranzvolumen resultiert näherungsweise aus dem freien Volumen innerhalb der lipophilen Doppelschicht und dem zusätzlichen Volumen $\Delta V = \Delta A \cdot d$, welches aus dem Flächenzuwachs ΔA folgt. Das freie Volumen ist insbesondere im fluiden Zustand nicht vernachlässigbar, da die Acylketten eine Vielzahl von gauche-Konformeren aufweisen.

Die Stoffmenge Phospholipid n_{DMPC} des Vesikels ist bei Annahme eines Platzbedarfs a von 0.65 nm^2 pro DMPC-Molekül [23] mit der Avogadro-Zahl N_A gegeben durch

$$n_{DMPC} = \frac{2A_0}{a} \cdot N_A. \quad (5.2)$$

Hierbei entspricht A_0 der Vesikelfläche der solubilisatfreien Doppelschicht zum Zeitpunkt $t = 0$. Das gesamte für die Solubilisierung zur Verfügung stehende Volumen V_s innerhalb der Doppelschicht folgt mit dem Volumen der Doppelschicht V_t zu einem Zeitpunkt t

$$V_s = V_t - (n_{DMPC} \cdot M_{DMPC} \cdot \bar{v}_{DMPC}), \quad (5.3)$$

mit \bar{v}_{DMPC} dem spezifischen Volumen von DMPC mit $0.970 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$ [134].

Die solubilierte Stoffmenge n_{Toluol} ist durch das Molvolumen V_m von Toluol gegeben, gemäß

$$n_{\text{Toluol}} = \frac{V_s}{V_m}. \quad (5.4)$$

Somit kann bei gegebener Dicke der Doppelschicht d die eingelagerte Toluolmenge und das Molverhältnis Toluol/DMPC abgeschätzt werden.

Zwischen der Biegesteifigkeit der Vesikelmembran und dem Molverhältnis Toluol/DMPC besteht gemäß den experimentellen Ergebnissen aus Kapitel 4 ein direkter Zusammenhang. Aus diesem Grunde ist das reale Molverhältnis zum Zeitpunkt t aus der Biegesteifigkeit in Abbildung 5-2 bestimmbar. In der Folge können diese experimentellen Ergebnissen mit den theoretischen Abschätzungen aus den geometrischen Veränderungen verglichen werden. Das Resultat ist in Abbildung 5-4 dargestellt.

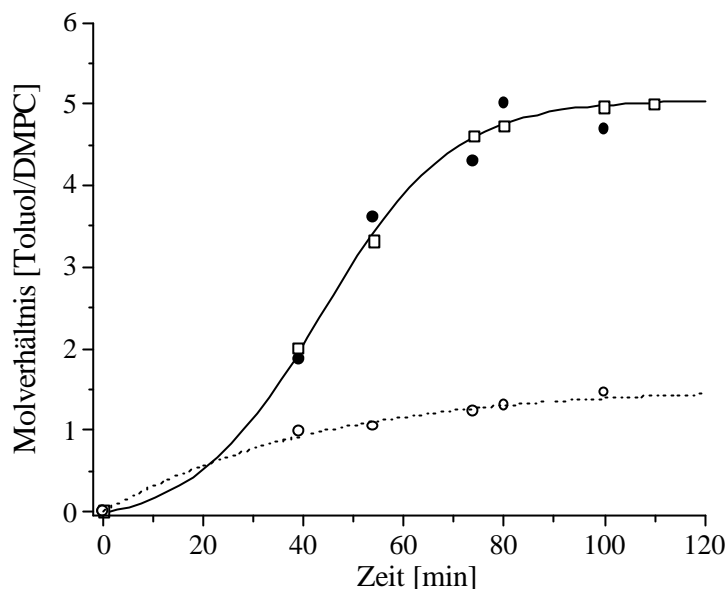


Abbildung 5-4: Vergleich der Molverhältnisse Toluol/DMPC innerhalb der Doppelschicht eines DMPC-Vesikels als Funktion der Diffusionszeit: Experimentelle Werte bestimmt aus den Biegesteifigkeiten (●), theoretische Abschätzung aus den geometrischen Änderungen unter Annahme konstanter Dicke $d = 3.5 \text{ nm}$ (○), sowie unter Berücksichtigung des Anstiegs der Dicke der Doppelschicht (□) (Erläuterungen im Text).

Der Vergleich zeigt, daß die theoretischen Molverhältnisse in Abbildung 5-4 unter der Annahme konstanter Dicke der Doppelschicht von 3.5 nm deutlich niedriger als die experimentell ermittelten sind. Diese Diskrepanz läßt sich folglich nur durch eine dreidimensionale Veränderung der Membrangeometrie unter gleichzeitiger Zunahme der Dicke der Doppelschicht erklären. Hierbei kann eine Erhöhung der effektiven Kettenlänge des Amphiphils angenommen werden, ein Effekt, der ebenfalls bei der Solubilisierung kurzkettiger n -Alkane diskutiert wird [135]. Die Vergrößerung der Dicke d der Doppelschicht von 3.5 nm auf 5 nm liefert eine gute Übereinstimmung mit den experimentell ermittelten Daten (vgl. Abbildung 5-4). Diese Dickenzunahme entspricht den Ergebnissen der Röntgenbeugungsexperimente nach Einlagerung von Toluol in lamellare DMPC-Phasen (vgl. Kapitel 2.3). Folglich führen theoretische Abschätzungen der Solubilisierung lipophiler Substanzen in DMPC-Vesikeln bei Annahme einer konstanten Dicke der Doppelschicht [134] zu einer Unterbestimmung des möglichen Solubilisierungsvermögens.

Die Ergebnisse lassen darauf schließen, daß die Solubilisierung von Toluol in Form einer palisadenartigen Einlagerung (vgl. Abbildung 5-5 (b)) unter lateraler Ausdehnung der Doppelschicht erfolgt. Gleichzeitig steigt die effektive Länge der Acylketten und entsprechend die Dicke der Doppelschicht bei konstantem inneren wässrigen Volumen des Vesikels an.

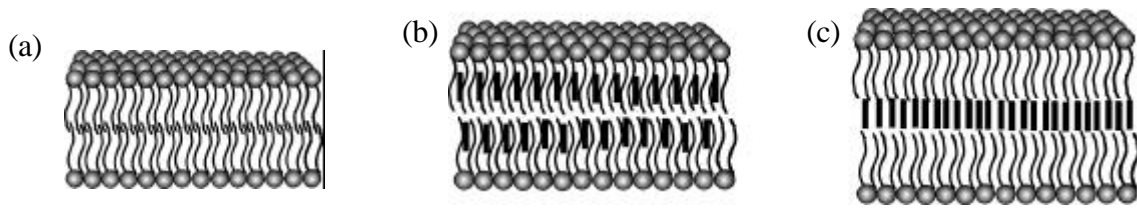


Abbildung 5-5: Schematische Darstellung der möglichen Lokalisierung eines lipophilen Solubilisats (dunkle Balken) in DMPC-Doppelschichten [136]: (a) unbeladene Doppelschicht, (b) Palisaden-Typ und (c) Kern-Typ.

Die Integrität der Doppelschicht bleibt während dieses Aufquellprozesses erhalten, wobei der effektive Platzbedarf des Amphiphils im Kopfgruppenbereich entsprechend dem Zuwachs der Gesamtfläche ebenfalls um etwa 10 % zunimmt. Eine weitere Zunahme sollte aufgrund des möglichen Eindringens von Wasser in den lipophilen Bereich zu erhöhten Grenzflächenspannungen führen.

Eine Einlagerung des Solubilisats zwischen den Monoschichten der Doppelschicht gemäß Abbildung 5-5 (c) wird vermutlich erst für Solubilisatkonzentrationen nahe des maximalen Solubilisierungsvermögens der Vesikel beobachtet. Hierdurch kommt es zu der beschriebenen mikroskopisch visualisierbaren Dickenzunahme der Membran (vgl. Abbildung 4-24).

Die laterale Ausdehnung der Membranfläche ΔA erfolgt im wesentlichen bei konstantem inneren Volumen V . Aus diesem Grunde steigt die Überschußfläche Δ an. Die geometrischen Parameter Δ und V können durch das reduzierte Volumen V_{red} in Beziehung gesetzt werden. Dieses kennzeichnet das Verhältnis des tatsächlich eingeschlossenen Volumens zu dem einer Sphäre des Radius r_0 gemäß

$$V_{\text{red}} = \frac{V}{\frac{4}{3}\pi r_0^3} = (1 + \Delta)^{\frac{3}{2}}. \quad (5.5)$$

Das Vesikel gewinnt Überschußfläche unter Abnahme des reduzierten Volumens (Abbildung 5-6). Hierdurch bedingt erfolgt demnach die Änderung der Vesikelgestalt.

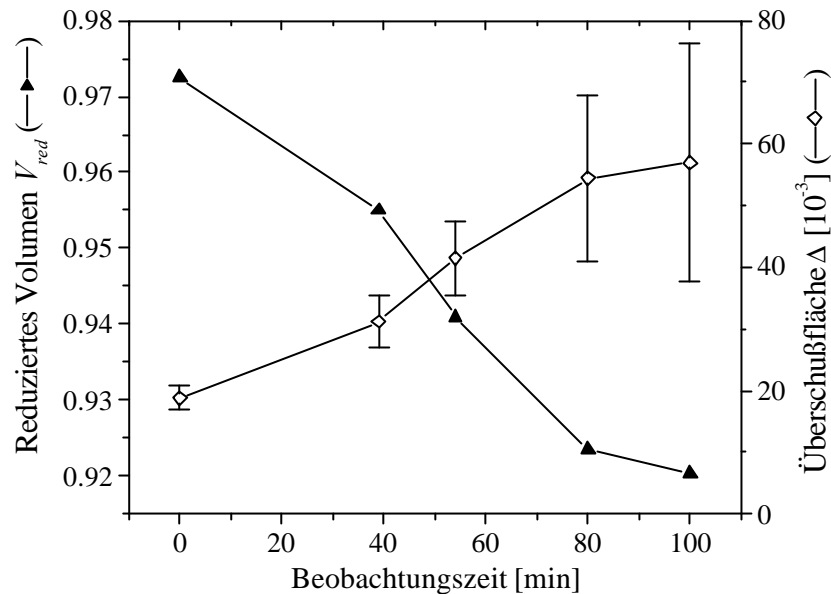


Abbildung 5-6: Verlauf der geometrischen Parameter als Funktion der Beobachtungszeit eines unilamellaren DMPC-Vesikels nach Diffusion von Toluol in den lipophilen Membranbereich.

5.1.1 Gestaltänderungen während der Solubilisierung

Die Vesikelmorphologie wird ferner durch Unterschiede der Flächen der inneren und der äußeren Monoschicht der Doppelschicht bestimmt. Aus diesem Grunde sollte eine Analyse der Vesikelgestalt während der Diffusion weiterhin Informationen über die bevorzugte Solubilisierung in den einzelnen Monoschichten liefern. Abbildung 5-7 zeigt eine typische Gestaltänderung. Diese erfolgt zunächst in Form einer elliptischen Deformation. Nach etwa 140 Minuten wird ein Übergang in eine in Bezug auf die horizontale Achse nicht-achsensymmetrische Gestalt beobachtet. Die resultierende „seesternförmige“ Struktur weist Bereiche unterschiedlicher Krümmung auf, so daß eine unsymmetrische Einlagerung des Solubilisats in den einzelnen Monoschichten zu erwarten ist.

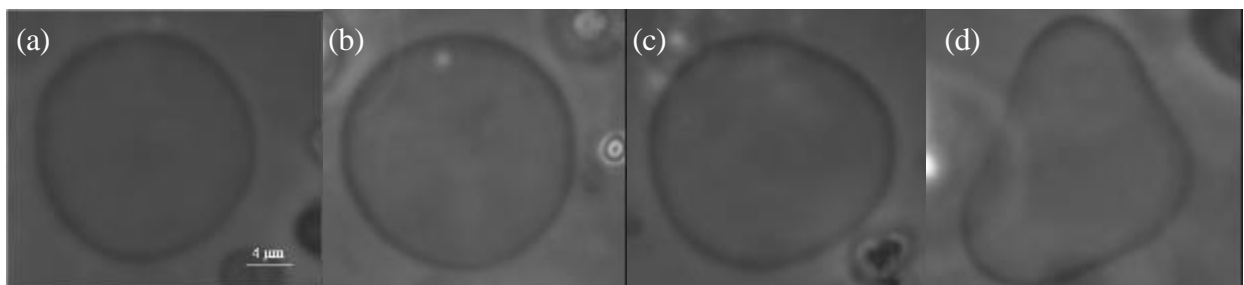


Abbildung 5-7: Unilamellares DMPC-Vesikel mit steigendem Anteil an Toluol innerhalb der lipophilen Doppelschicht. Die Bilder entsprechen einer zeitlichen Abfolge von jeweils 70 Minuten bei konstanter Temperatur von 31.5°C.

5.1.2 Domänenbildung und Knospung der Vesikelmembran

Der Eintrag von Toluol in unilamellare Vesikel führt nicht ausschließlich zur Bildung seesternförmiger Strukturen. Es konnten durchaus Unterschiede in den resultierenden Formen beobachtet werden, so daß angenommen werden kann, daß letztendlich die Vesikelstruktur vor der Solubilisierung prägend ist.

In dem in Abbildung 5-8 dargestellten Beispiel eines Diffusionsexperimentes deutet die Gestaltänderung zunächst auf eine homogene Einlagerung von Toluol hin. Aufgrund der lateralen Ausdehnung der Doppelschicht kommt es zu einer elliptischen Deformation der sphärischen Vesikelstruktur. Im Verlauf der Diffusion von Toluol in die Doppelschicht erfolgt jedoch eine Knospung eines kleinen Vesikels in das Innere der Struktur. Bei diesem Knospungsphänomen handelt es sich vermutlich um ein „domäneninduziertes Knospen“, dessen Ursache in der Bildung einer toluolreichen Phase innerhalb der Doppelschicht zu suchen ist.

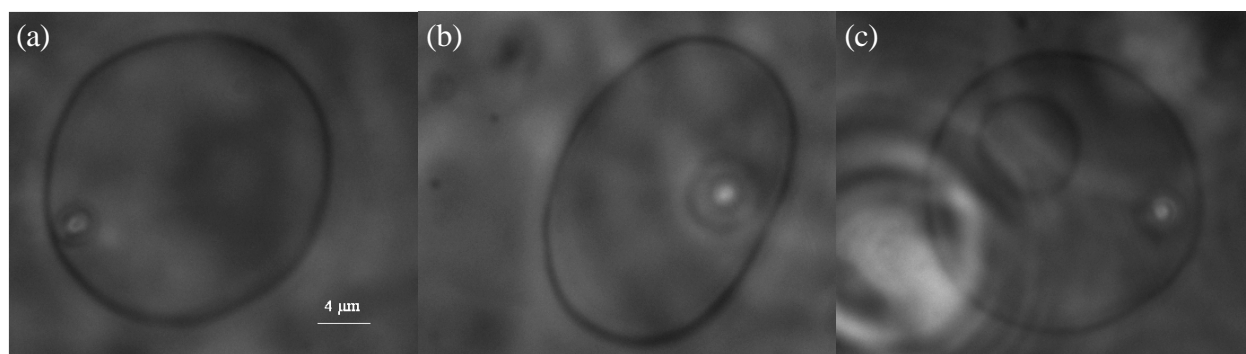


Abbildung 5-8: Änderung der Gestalt eines DMPC-Vesikels unter dem Einfluß von Toluol nach diffusivem Eintrag in die Doppelschicht. Das nahezu sphärische Vesikel (a) zeigt eine elliptische Verformung (b) und eine anschließende Knospung (c). Die Bildung der Knospe erfolgt im Bereich minimaler Membrankrümmung.

Die bereits diskutierte Koexistenz einer toluolreichen neben einer toluolarmen Phase könnte die Ursache derartiger Knospungsphänomene sein. Entmischungsprozesse in zweidimensionalen Systemen reduzieren die Grenzflächenspannung zwischen den beiden Phasen auf eine Linienspannungen. Hierdurch wird oftmals eine erniedrigte Triebkraft zur vollständigen Entmischung beobachtet. Ein möglicher Grund für die Stabilisierung sind die unterschiedlichen Krümmungen der Amphiphile im Bereich der Phasengrenze [137]. In einigen Fällen kann eine Koexistenz zweier Phasen auf mikroskopischer Ebene beobachtet werden, wobei Gel-Fluid-Systeme über mehrere Wochen stabil sind [138].

Die Koexistenz unterschiedlicher Phasen innerhalb einzelner Vesikel hat eine Domänenbildung einer Phase B in der umgebenden Phase A zur Folge. Aufgrund des unterschiedlichen Platzbedarfs von Kopfgruppe und lipophilem Bereich kommt es zu unterschiedlichen Packungen innerhalb der Vesikel und zu einer Kopplung zwischen der Zusammensetzung

und der Vesikelgestalt. Die im Bereich der Domänengrenzen auftretenden Linienspannungen können minimiert werden, falls die Domänen knospen und in Form sogenannter „Buds“ separiert werden. Bei wachsender Größe der Domänen steigt somit der Betrag der Linienspannung. Erreicht die Domäne eine kritische Größe, so wird ein „domäneninduziertes Knospen“ ermöglicht (Abbildung 5-9).

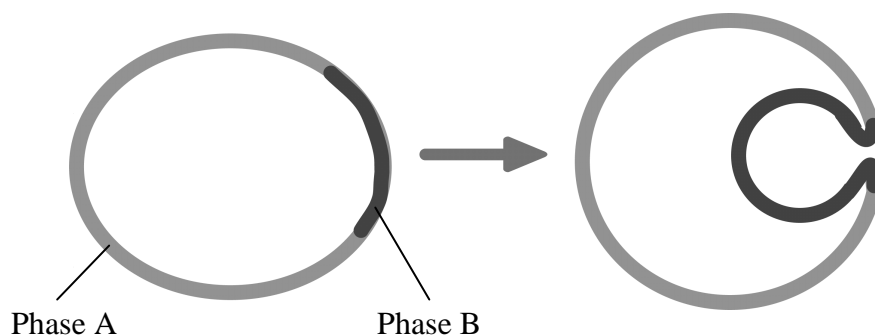


Abbildung 5-9: Prinzip der Erniedrigung der Grenzflächenenergie einer Phase B und einer Phase A eines sphärischen Vesikels. Die Minimierung der Grenzfläche erfolgt durch Knospung („Budding“) unter Ausbildung eines kleinen „B-reichen“ Vesikels, welches über einen schmalen Hals mit dem „Muttersvesikel“ verbunden bleibt. Eine Ursache der bevorzugten Abschnürung in Richtung der konkaven Seite kann beispielsweise ein Überschuss an Molekülen in der inneren Monoschicht des Vesikels sein.

Während Phasenseparationen in kristallinen Materialien in Form von Nukleationsprozessen erfolgen, dominiert in Lipiddoppelschichten vermutlich die spinodale Entmischung [137]. Theoretische Berechnungen von Phasendiagrammen ergaben zwei mögliche Arten von stabilen Domänen [139], die experimentell bestätigt werden konnten [140]. Streifenartige Domänen werden für Membranen mit Gel-Fluid-Koexistenzen beobachtet, während kreisförmige Domänen im Falle der Entmischung zweier fluider Phasen auftreten.

Ein weiteres in diesem Zusammenhang interessantes, jedoch nicht reproduzierbares Beispiel ist in Abbildung 5-10 dargestellt. Das beobachtete undulierende Vesikel zeigt eine Vielzahl von Knospen, deren mögliche Ursache in der spinodalen Entmischung und anschließenden Knospung der toluolreichen Bereiche liegen könnte.

Aus Abbildung 5-10 kann die Linienspannung G aus der Größe der Knospen gemäß [141]

$$G = \frac{8k_c}{r_{Bud}} \quad (5.6)$$

abgeschätzt werden. Für das Beispiel in Abbildung 5-10 folgt $G = 3.9 \cdot 10^{-13} \text{ J} \cdot \text{m}^{-1}$. Die ermittelte Linienspannung ist folglich geringfügig niedriger als diejenige von Phospholipid/Cholesterin-Mischungen mit $G \approx 1 \cdot 10^{-12} \text{ J} \cdot \text{m}^{-1}$ [142].

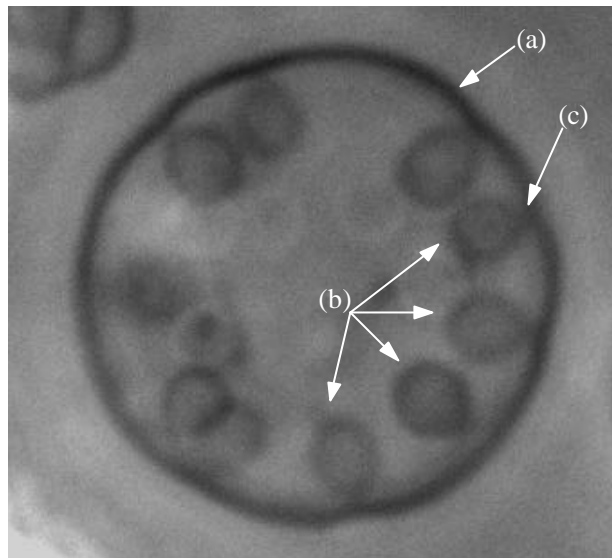


Abbildung 5-10: Unilamellares DMPC-Vesikel ($r_{\text{Vesikel}} = 17.6 \mu\text{m}$) nach Solubilisierung von Toluol (80 Mol-%). Die Membran (a) weist symmetrisch angeordnete Knospen (b) auf, die in das wässrige innere Kompartiment der Struktur ragen und über die gesamte Vesikelfläche verteilt sind. Die Knospen sind über einen schmalen Hals (c) mit der äußeren Membran verbunden und haben nahezu identische Größen ($r_{\text{Bud}} = 2.3 \pm 0.3 \mu\text{m}$). Das Vesikel zeigt thermisch angeregte Undulationen mit einer Biegesteifigkeit $k_c = (1.13 \pm 0.15) \text{ J}$ und einer effektiven Spannung von $\bar{\sigma} = 12.5 \pm 4.5$, die den unilamellaren Charakter bestätigen.

5.1.3 Krümmungsinduziertes Domänenwachstum

Die Solubilisierung führt im Bereich hoher Solubilisatkonzentrationen zum Anstieg der effektiven Spannung der Membran. Hierdurch bedingt, werden, wie bereits diskutiert, thermisch bedingte Fluktuationen unterdrückt. Neben Knospungserscheinungen erfolgt eine Phasenseparation des Solubilisats unter Ausbildung mikroskopisch visualisierbarer Toluol-domänen innerhalb der Doppelschicht einzelner Vesikel. Die Phasenseparation tritt bei nahezu toluolgesättigter Wasserphase auf und resultiert allein aus dem molekularen Stofftransport von Toluol über die Wasserphase in den lipophilen Bereich der Doppelschicht. Sie erfolgt bevorzugt im Bereich hoher Membrankrümmungen, welche im Halsbereich von Knospen zu finden sind (vgl. Abbildung 5-11) und sollte somit die Folge eines verminderten Laplace-Drucks in dieser Region sein.

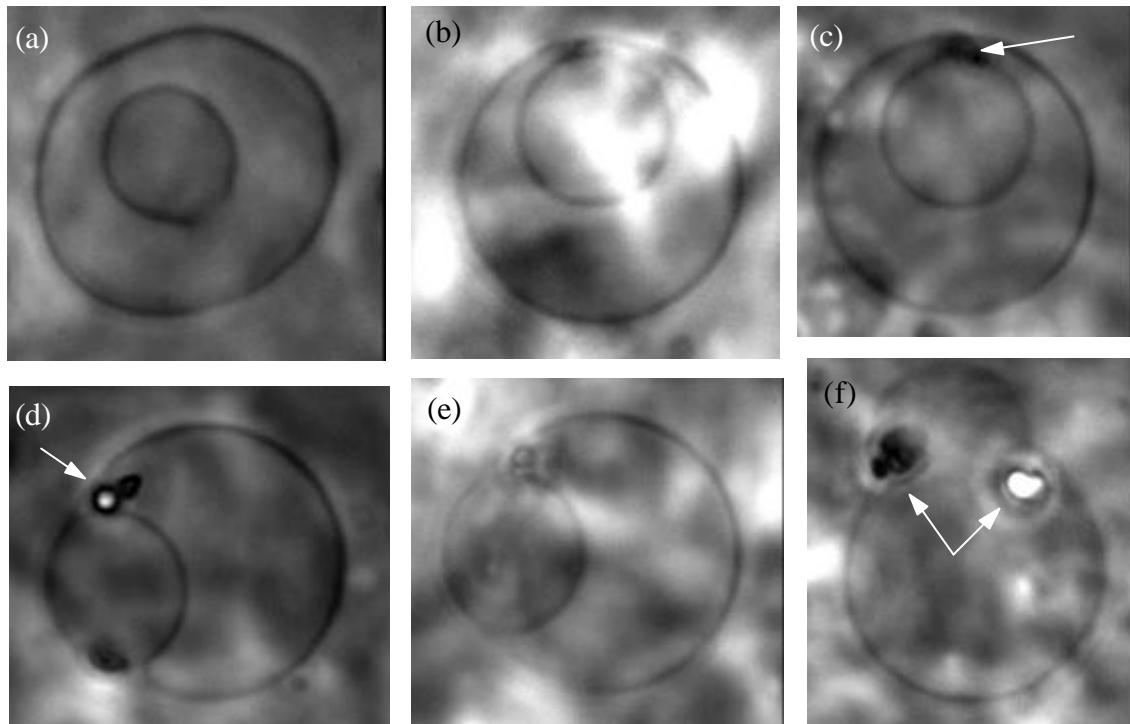


Abbildung 5-11: (a) DMPC-Vesikel mit Knospe nach Solubilisierung von Toluol. Im Verlauf der Diffusion des Solubilisats in die lipophile Doppelschicht kommt es zur tropfenförmigen Phasenseparation von Toluol im Bereich hoher Membrankrümmung (c). Die Toluolphase wächst an und verursacht ungewöhnliche Umlagerungen der Membran (d)-(f). Innerhalb der Vesikelstruktur koexistieren hierbei separate Überschussphasen des Solubilisats (f), Markierung mittels Pfeilen.

Im Halsbereich der Knospe ist die Packung der Lipide aufgrund der hohen Krümmungen stark gestört und weist im lipophilen Bereich eine große Anzahl von Defekten auf. Diese führen zu einer Anreicherung des lipophilen Solubilisats, so daß es hier zu verstärkten Segregationen kommen kann. Die visualisierbare Überschussphase von Toluol in der Membran stört ihrerseits die umgebende Amphiphilpackung und wirkt als Senke für weiteres Toluol; der entstandene Tropfen wächst an.

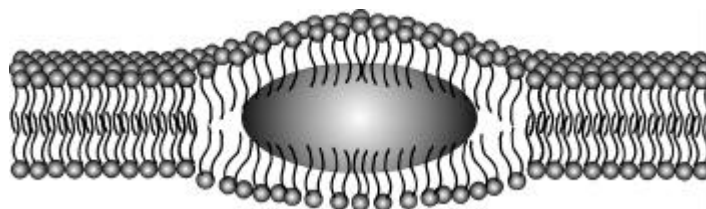


Abbildung 5-12: Schematische Darstellung einer ölreichen Domäne innerhalb der Doppelschicht. Die Ölphase ist umgeben von einem Halo von Amphiphilen mit gestörter Packung, so daß dieser Bereich wiederum als Senke für die Anreicherung weiterer lipophiler Substanzen wirken kann.

Interessanterweise kann die Koexistenz verschiedener ölreicher Domänen innerhalb einzelner Vesikel beobachtet werden, obwohl die erhöhte Linienspannung zu einer Aggregation der einzelnen Domänen führen sollten. Eine mögliche Erklärung ist die von Mountford und Wright postulierte Stabilisierung derartiger Domänen durch Bildung inverser mizellarer Anordnungen des Amphiphils an den Randbereichen [143]. Eine derartige Konstellation sollte ferner aufgrund des stark erhöhten Packungsparameters P unter dem Einfluß des Solubilisats begünstigt werden.

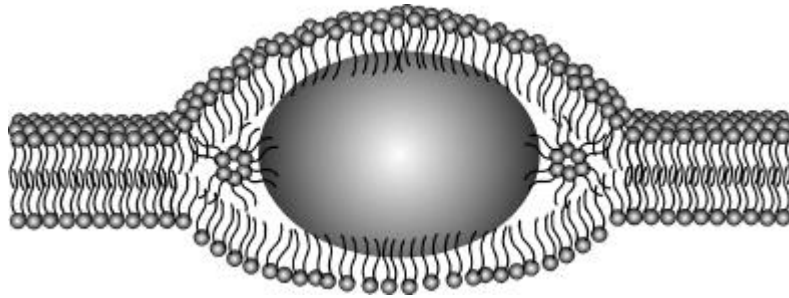


Abbildung 5-13. Mögliche Anordnung der Phospholipide an der Grenzfläche einer Domäne eines lipophilen Solubilisats. Durch die Ausbildung inverser Mizellen erfolgt eine Stabilisierung der Domäne innerhalb der Lipiddoppelschicht.

5.1.4 Zusammenfassung

Die Diffusion einer begrenzt wasserlöslichen Substanz wie Toluol erlaubt den Eintrag in die Doppelschicht von Phospholipidvesikeln. Die Solubilisierung von Toluol in unilamellaren DMPC-Vesikeln erfolgt hierbei zunächst in Form einer palisadenförmigen Einlagerung im Zwischenlipidbereich. Diese bedingt eine laterale Ausdehnung der Membranfläche großer unilamellarer Vesikel um etwa 10 % bei konstantem inneren Volumen. Gleichzeitig steigt die Dicke der Doppelschicht als Folge der Zunahme der effektiven Länge der Acylketten um etwa 1 nm an. Die Solubilisierung erfolgt unter Erhalt der Integrität der Doppelschicht, wobei die Biegesteifigkeit k_c der Doppelschicht trotz Dickenzunahme deutlich absinkt. Das Ausmaß der lateralen wie auch transversalen Ausdehnung zeigt gute Übereinstimmungen mit den Ergebnissen der Röntgenbeugung nach Solubilisierung von Toluol in lamellare DMPC-Phasen.

Die Volumenkonstanz des inneren wäßrigen Vesikelvolumens bedingt aufgrund der Flächenzunahme eine Änderung der Vesikelgestalt. Dieser Effekt entspricht der thermisch bedingten Ausdehnung von Vesikeln. Ausgehend von einer Kugel, die bei konstantem Volumen eine minimale Fläche aufweist, entstehen durch die Solubilisierung ellipsoide Vesikelformen.

Im Bereich hoher Solubilisatkonzentrationen lassen sich Formumwandlungen zu Strukturen niedrigerer Symmetrie beobachten. Hierbei kommt es oftmals zu Membranknospungen vergleichbar mit Vorgängen der Endocytose, die vermutlich eine Folge der Minimierung

von Linienspannungen im Bereich toluolreicher Domänen sind. Das hierdurch bedingte Auftreten hoher Krümmung bewirkt in der Folge eine bevorzugte Anreicherung von Toluol und führt ferner zu visualisierbaren, separierten Überschußphasen des Solubilisats im Bereich der Doppelschicht. Die Bildung der Überschußphase tritt in Form einer Interkalation zwischen den Monoschichten gemäß Abbildung 5-5 (c) auf und führt zu stabilen, mikroskopisch visualisierbaren Toluoldomänen. Die Solubilisierung erfolgt letztendlich auf Kosten der Überschußfläche, so daß Vesikel im Bereich maximaler Solubilisierungskapazität hohe effektive Spannungen aufweisen und keinerlei Undulationen detektiert werden können.

5.2 Kinetik der Solubilisierung lipophiler Substanzen

In Wasch- und Reinigungsprozessen wird die Löslichkeit wasserunlöslicher Substanzen durch den Zusatz lösungsvermittelnder Stoffe erhöht. Liegt die Konzentration des Amphiphils oberhalb der kritischen Mizell- bzw. Vesikelbildungskonzentration, erfolgt im allgemeinen eine Solubilisierung in Form des Einbaus der unlöslichen Substanz in den lipophilen Bereich der Assoziationsaggregate. Während mizellare Systeme in Bezug auf Solubilisierungskapazitäten und Solubilisierungsraten lipophiler Substanzen recht gut charakterisiert sind, ist diesbezüglich über Vesikel nur wenig bekannt. Dies war Motivation für die folgenden Untersuchungen, die einen Einblick in den Mechanismus der Solubilisierung durch unilamellare Vesikel geben sollen.

5.2.1 Methoden zur Bestimmung von Solubilisierungsraten

Untersuchungen der Solubilisierungsrate lipophiler Substanzen unter Nicht-Gleichgewichtsbedingungen dienen oftmals der mechanistischen Aufklärung von Solubilisierungsprozessen. Hierzu ist eine simultane Analyse der Größe der Phasengrenzfläche sowie des Volumens als Funktion der Zeit erforderlich. Es existieren einige zumeist optische Methoden, die zur Untersuchung des Solubilisierungsverhaltens mizellbildender Amphiphile angewendet werden. Die „Drop-on-fiber“-Technik beruht auf der mikroskopischen Analyse des zeitlichen Größenabnahme eines auf einer zylindrischen Faser adsorbierten Tropfens in einer Tensidlösung [144]. Durch Ermittlung des Tropfenvolumens V und der Grenzfläche A ist es möglich, die grenzflächenbezogene Solubilisierungsrate $[-A^{-1} (dV/dt)]$ zu bestimmen.

Eine abgewandelte Methode beruht auf der Injektion der zu solubilisierenden Flüssigkeit in die Tensidlösung unter Analyse des frei schwebenden Tropfens [145]. Zur Untersuchung der Solubilisierungsrate von Feststoffen dient die Technik der rotierende Scheibe [146]. Der Feststoff wird auf eine Scheibe aufgebracht und diese nach Einfüllen der Tensidlösung im Reaktionsraum in Rotation versetzt. Der Vorteil dieser Methode ist die Berücksichtigung unterschiedlicher Strömungseinflüsse während des Solubilisierungsprozesses.

5.2.2 Solubilisierungsraten lipophiler Substanzen in Vesikeln

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen der Solubilisierungsrate erfolgten mit Hilfe der Videomikroskopie unter Verwendung der Injektionsmethode [145]. Hierbei wird ein Tropfen einer lipophilen Substanz mit Hilfe einer Spritze in die mit der Vesikeldispersion gefüllte Reaktionskammer gefüllt und die Tropfengröße als Funktion der Zeit unter Verwendung der Videomikroskopie analysiert (Abbildung 5-14). Das Phospholipid liegt im Vergleich zur verwendeten lipophilen Substanz im Überschuß vor, so daß eine Interaktion ölbeladener Vesikel mit dem Tropfen vernachlässigbar ist.

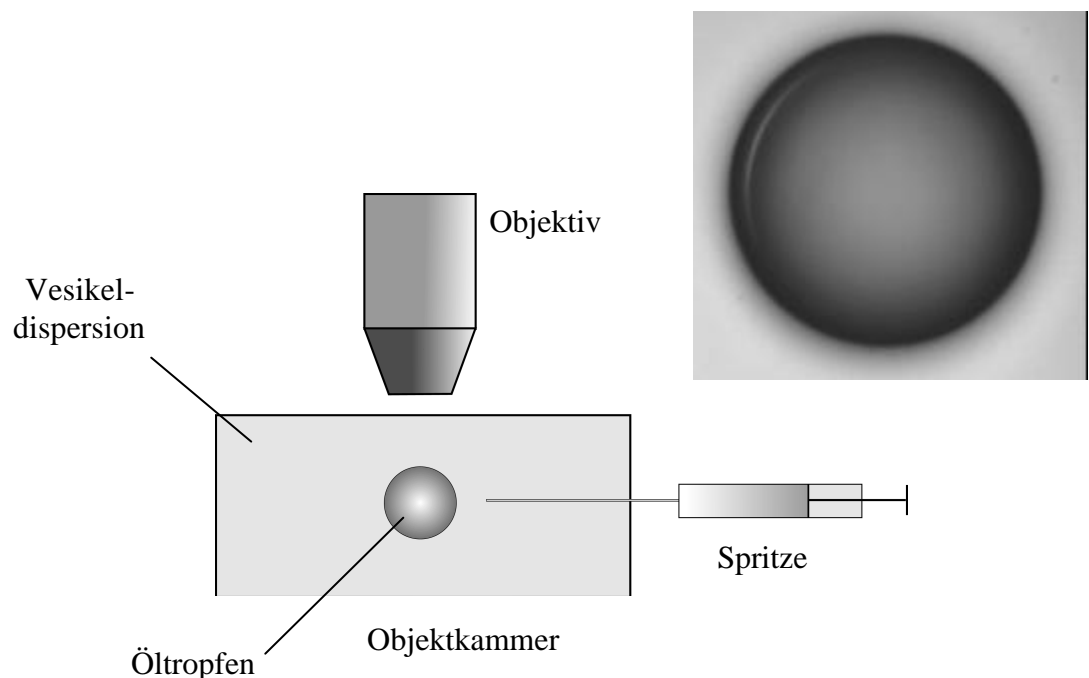


Abbildung 5-14: Schematischer Versuchsaufbau der Objektkammer der Injektionsmethode zur Bestimmung der Solubilisierungsrate mit Hilfe der Videomikroskopie sowie videomikroskopische Aufnahme eines Hexadecantropfens (oben rechts).

Die Untersuchungen erfolgten bei konstanter Temperatur unter Verwendung nahezu wasserunlöslicher lipophiler Substanzen. Abbildung 5-15 zeigt exemplarisch die zeitliche Entwicklung der Tropfenradien einzelner Chlorcyclohexantropfen zur Ermittlung der grenzflächenbezogenen Solubilisierungsrate $[-A^{-1} (dV dt^{-1})]$.

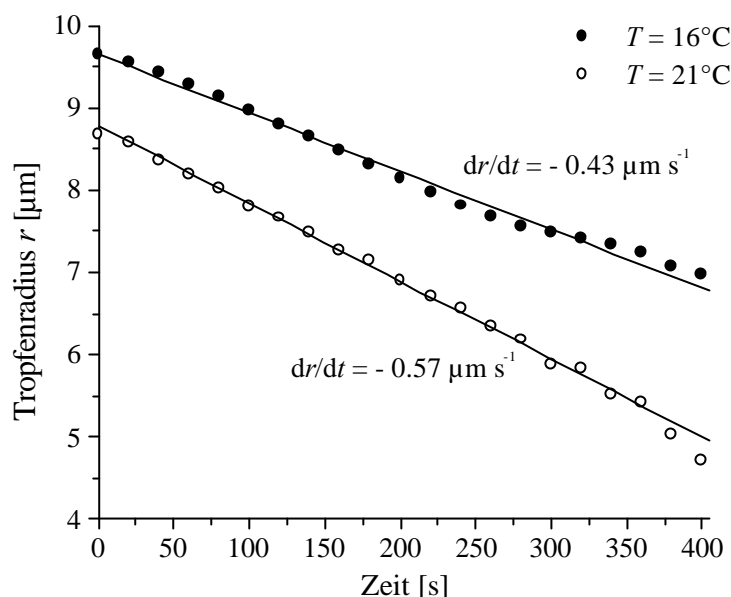


Abbildung 5-15: Zeitliche Entwicklung der Radien einzelner Chlorcyclohexantropfen ($r = 1.00 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$) in einer Dispersion unilamellarer DMPC-Vesikel ($c = 10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) bei einer Temperatur von 16°C (—●—) sowie 21°C (—○—).

Aus dem nahezu linearen Verlauf der Daten können die Solubilisierungsraten $-dr \cdot dt^{-1}$ ermittelt werden (Tabelle 5-1). Für den beobachteten Bereich von Tropfendurchmessern zwischen $5 \mu\text{m}$ und $30 \mu\text{m}$ zeigte sich keinerlei Abhängigkeit von der Tropfengröße jedoch von der Amphiphilkonzentration. Die Solubilisierungsraten unlöslicher Substanzen sinken im allgemeinen mit steigendem Molvolumen des Solubilisats.

Tabelle 5-1: Ermittelte Solubilisierungsraten $-dr \cdot dt^{-1}$ lipophiler Substanzen unterschiedlicher Wasserlöslichkeit unter Verwendung unilamellarer Phospholipidvesikel ($c = 10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) konstanter Vesikelgröße.

Solubilisat	Molvolumen [mol mL^{-1}]	Wasserlöslichkeit [mg L^{-1}] [132]	Lipid	Temperatur [$^\circ\text{C}$]	$-dr \cdot dt^{-1}$ [$\mu\text{m min}^{-1}$]
Toluol	106	470	DMPC	25	1.5
Chlorcyclohexan	119	20	DMPC	25	0.84
Hexadekan	294	$5.6 \cdot 10^{-5}$	DMPC	25	0.60
Hexadekan	294	$5.6 \cdot 10^{-5}$	DPPC	42	0.75

Die Solubilisierungsraten sind unter Verwendung unlöslicher Substanzen wie Chlorcyclohexan und Hexadekan vernachlässigbar bzw. nicht zu beobachten. Für wasserunlösliche Substanzen spielt somit die Diffusion der Substanz in die Wasserphase in Bezug auf die Solubilisierungsrate eine vernachlässigbare Rolle.

Die beobachtbaren zeitlichen Abhängigkeiten der Solubilisierungsraten sind analog der Ergebnisse mizellarer Systeme.

Anhand von Untersuchungen der Solubilisierung unlöslicher Öle (mit Löslichkeiten kleiner als 10^{-6} Gew.-%) konnte unter Verwendung nichtionischer Tenside in Konzentrationen oberhalb der kritischen Mizellbildungskonzentration *cmc* gezeigt werden, daß die Solubilisierungsraten vermutlich durch Prozesse an der Tropfenoberfläche dominiert werden [144]. Theoretische Abschätzungen einer Dominanz der Diffusion der Mizellen zur Phasengrenzfläche liefern weitaus höhere Solubilisierungsraten als die beobachteten [147]. Eine detaillierte Aufklärung der letztendlich geschwindigkeitsbestimmenden Mechanismen konnte jedoch nicht im Detail erfolgen.

Abbildung 5-16 zeigt den temperaturabhängigen Verlauf der Solubilisierungsrate verschiedener lipophiler Substanzen in DMPC-Vesikeln. Im Bereich oberhalb der Phasenumwandlungstemperatur T_m der Vesikel wird eine auffällige Erhöhung der Solubilisierungsrate deutlich. Diese sollte einerseits eine Folge des erhöhten freien Volumens innerhalb der Doppelschicht und die hierdurch bedingte bereits diskutierte größere Solubilisierungskapazität sein. Eine Beeinflussung durch die höhere Flexibilität der Doppelschicht und die damit begünstigte Wechselwirkung mit der Phasengrenzfläche ist jedoch ebenfalls denkbar.

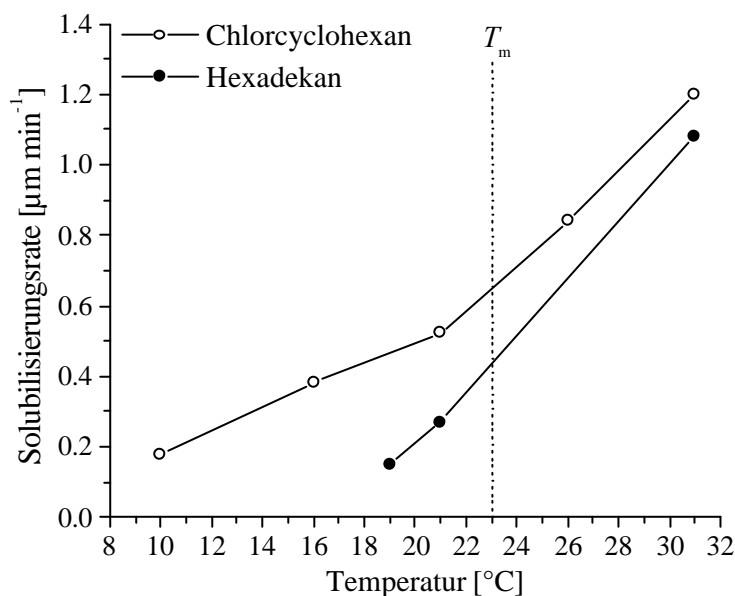


Abbildung 5-16: Temperaturabhängigkeit der Solubilisierungsrate dr/dt lipophiler Substanzen durch kleine unilamellare DMPC-Vesikel. Die gepunktete Linie markiert die Phasenumwandlungstemperatur T_m der Vesikel, oberhalb derer sich die Doppelschicht der Vesikel im fluiden Zustand befindet.

Im Hinblick auf die mögliche Dominanz von Prozessen an der Grenzfläche Öl/Wasser wird im folgenden Mechanismen der Interaktionen der Vesikel mit der Phasengrenzfläche detailliert untersucht.

5.2.3 Mechanistische Betrachtung des Solubilisierungsprozesses

Abbildung 5-17 zeigt den zeitlichen Verlauf der Grenzflächenspannung eines Hexadecantropfens in einer stark verdünnten Dispersion kleiner unilamellarer DMPC-Vesikel. Die Grenzflächenspannung wurde mit Hilfe eines optischen Kontaktwinkelmeßgerätes bestimmt.

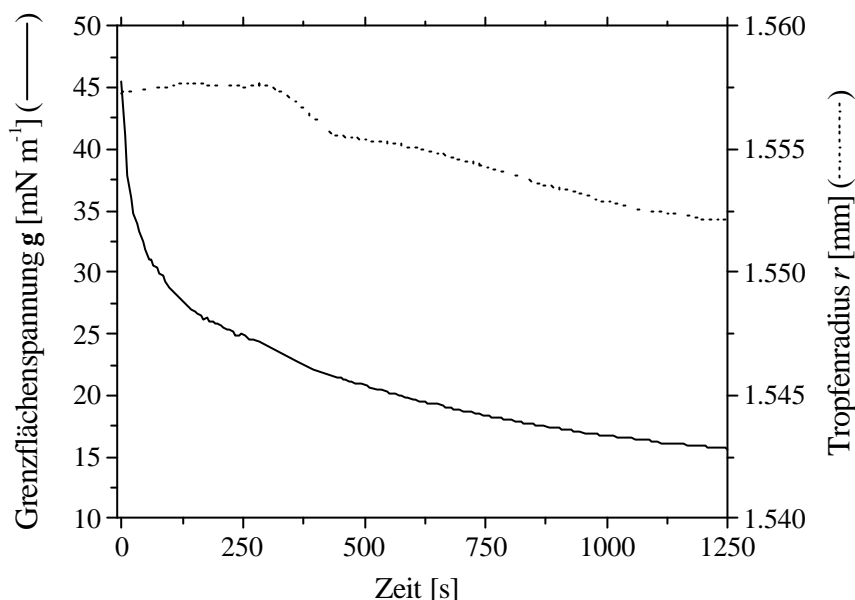


Abbildung 5-17: Verlauf der Grenzflächenspannung g sowie des Radius r eines Hexadecantropfens ($V = 16 \mu\text{L}$) in einer verdünnten Dispersion kleiner unilamellarer DMPC-Vesikel ($c = 1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) bei 25°C . Die Ermittlung der Grenzflächenspannung erfolgte mit Hilfe der Tropfengestalts-Analyse eines optischen Kontaktwinkelmeßgerätes.

Hierbei kann zunächst eine Initiierungsphase der Solubilisierung beobachtet werden, die auf einen Prozeß der Diffusion der Vesikel zur Phasengrenzfläche zurückzuführen ist. Die Koaleszenz der Vesikel mit der Grenzfläche Öl/Wasser führt vermutlich zunächst zu einer Monoschichtbelegung durch das Amphiphil unter Erniedrigung der Grenzflächenspannung. Die Solubilisierungsrate ist während dieser Phase entsprechend klein. Erst nach einer deutlichen Erniedrigung der Grenzflächenspannung wird eine signifikante Abnahme des Tropfenradius beobachtbar.

Neben der Koaleszenz der Vesikel unter Ausbildung einer Monoschicht ist die Adsorption der Vesikel an der Phasengrenzfläche Öl/Wasser mit anschließender Solubilisierung des Öls und Diffusion des ölbeladenen Aggregats in die Bulkphase möglich. Bei nahezu vollständiger Monoschichtbelegung sollte letztgenannter Prozeß dominieren. Die einzelnen Schritte der Solubilisierung durch Vesikel sind schematisch in Abbildung 5-18 dargestellt.

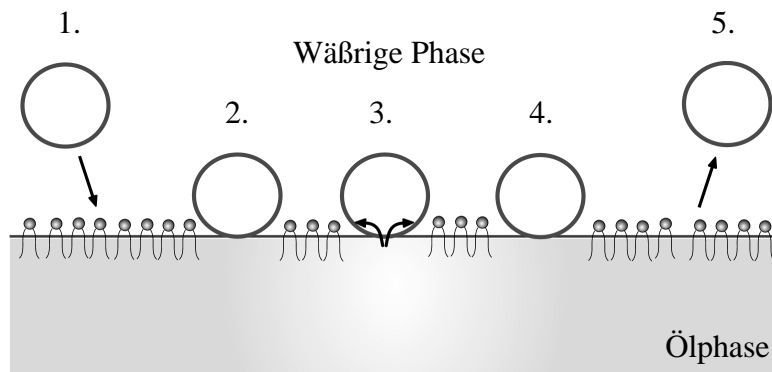


Abbildung 5-18: Modell der Interaktion von Vesikeln (vereinfachte Illustration der Doppelschicht als Liniendarstellung) mit der Grenzfläche Öl/Wasser unter Solubilisierung des Öls. 1. Diffusion zur Grenzfläche, 2. Adsorption, 3. Eintrag des Öls in die Doppelschicht bzw. Austausch von Amphiphilmolekülen, 4. Desorption unter Abspaltung des Vesikels, 5. Diffusion des ölbeladenen Vesikels in die Bulkphase.

Die mikroskopischen Beobachtungen, die in Abbildung 5-19 (a) dargestellt sind, bestätigen die Existenz adsorbierter, vesikulärer Strukturen im Bereich der Phasengrenzen Öl/Wasser. Diese desorbieren im Verlauf des Prozesses vermutlich von der Phasengrenzfläche. Gleichzeitig ist ein Anwachsen der ölbeladenen Doppelschichtstrukturen im Bereich der Grenzfläche (Abbildung 5-19 (b)) unter anschließender Desorption zu beobachten.

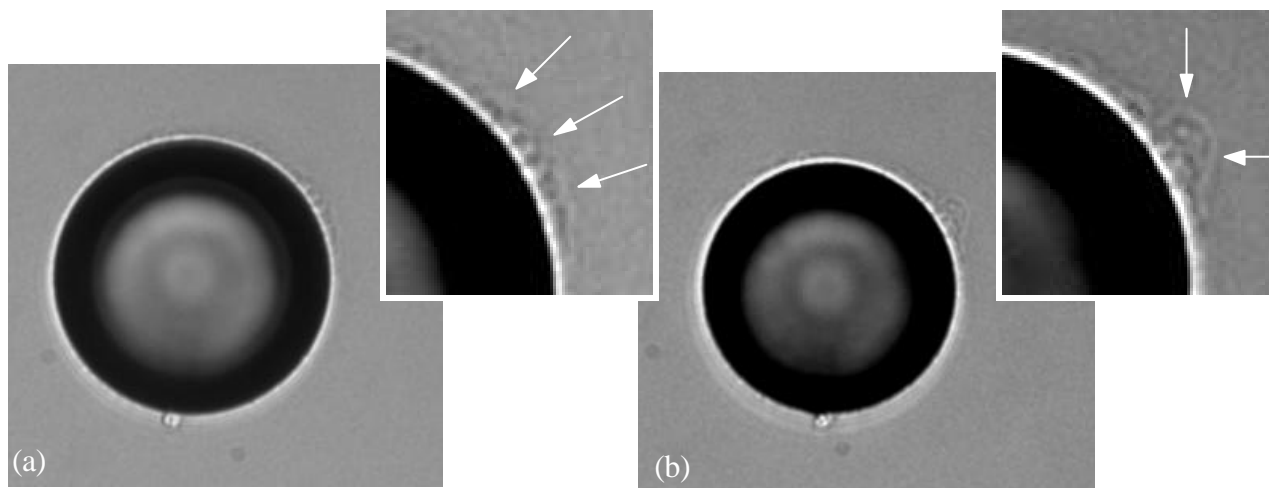


Abbildung 5-19: Videomikroskopisch beobachtbare Prozesse an der Grenzfläche Chlorcyclohexan/Wasser bei 30°C. (a) Adsorbierte vesikuläre Strukturen von DMPC an der Grenzfläche (Markierung mittels Pfeilen im vergrößerten Bildausschnitt), die im zeitlichen Verlauf zu größeren Aggregaten anwachsen und desorbieren (b).

Die beschriebenen Grenzflächenphänomene und insbesondere die in Abbildung 5-19 (b) dargestellten Prozesse der Desorption der ölbeladenen Doppelschichtstrukturen sind mit lokalen Deformationen der vesikulären Strukturen verbunden. Aus diesem Grunde sollten die elastischen Eigenschaften des Amphiphils und insbesondere die Biegesteifigkeit k_c die Desorptionsprozesse signifikant beeinflussen. Niedrige Elastizitätsmoduln, aber auch flexible Grenzflächen begünstigen somit den Solubilisierungsprozeß des Öls.

Da die Tropfenfläche im Verlauf der Solubilisierung sinkt, sollte sich der Amphiphilfilm auf der Grenzfläche verdichten und in der Folge kollabieren. Derartige Beobachtungen zeigen sich im Bereich kleiner Tröpfchen (Abbildung 5-20), die jedoch oftmals auf der Glasfläche der Beobachtungszelle spreiten, so daß ein Einfluß auf die Solubilisierungsrate nicht ermittelt werden kann.

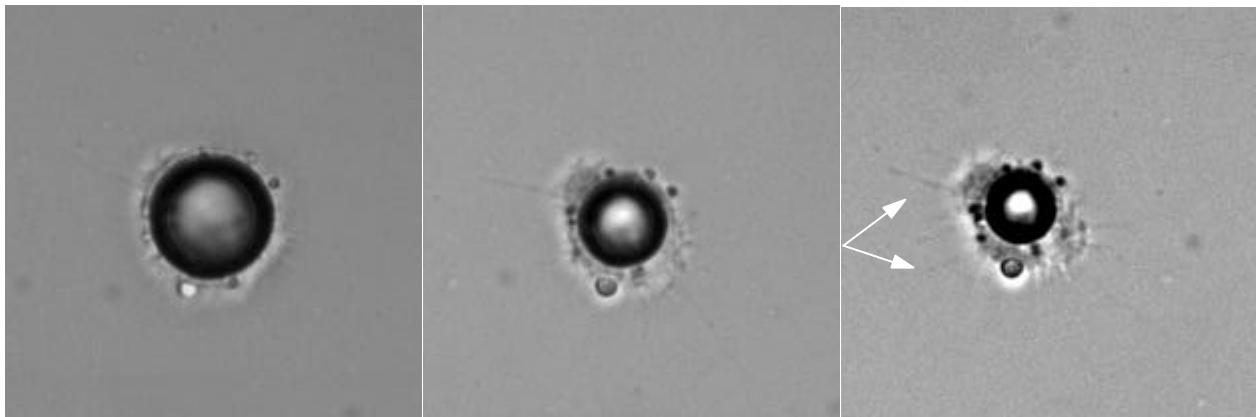


Abbildung 5-20: Ausbildung flüssigkristalliner Strukturen von DMPC sowie kleine tropfenförmige Aggregate an der Öl/Wasser Grenzfläche eines Hexadekan-Tropfens ($r_0 = 4.5 \mu\text{m}$) als Folge der kollabierenden Monoschicht. Die Pfeile markieren tubusförmige Doppelschichtstrukturen, die zum Teil an der Glasoberfläche der Beobachtungszelle adsorbieren.

5.2.4 Zusammenfassung

Die Untersuchung der Kinetik der Solubilisierung wasserunlöslicher lipophiler Substanzen durch unilamellare Vesikel mit Durchmessern unterhalb von 200 nm liefert deutliche Analogien zu Ergebnissen der Untersuchung mizellarer Systeme [144,148].

Im Verlauf des Solubilisierungsprozesses erfolgt zunächst eine Monoschichtbelegung der Grenzfläche mit dem Phospholipid unter signifikanter Erniedrigung der Grenzflächenspannung. Nach einer kurzen Initiierungsphase zeigt sich somit eine konstante grenzflächenbezogene Solubilisierungsrate [$-A^{-1} (dV/dt)$]. Diese ist sowohl von der Temperatur, als auch von der Natur des Solubilisats abhängig. Die Solubilisierungsraten werden vermutlich entsprechend mizellaren Systemen durch Prozesse an der Öl/Wasser-Grenzfläche domi-

niert. Mikroskopische Untersuchungen weisen darauf hin, daß Krümmungsänderungen der ölbeladenen Doppelschichtstrukturen im Bereich der Phasengrenzfläche auftreten, wobei die elastischen Eigenschaften des Amphiphils und insbesondere die Biegesteifigkeit k_c einen Einfluß auf diese Prozesse aufweisen sollten. Niedrige Elastizitätsmoduln begünstigen den Solubilisierungsprozeß des Öls und tragen vermutlich zu einer erhöhten Solubilisierungsrate bei Temperaturen oberhalb der Phasenumwandlung in die flüssig-kristalline Phase der Vesikel bei.

6 Einfluß von Vesikeln auf das mutagene Potential lipophiler Schadstoffe

6.1 Bedeutung von Vesikeln im Hinblick auf Mobilisierungserscheinungen

Phospholipiden kommt im Bereich umweltrelevanter Prozesse eine besondere Bedeutung zu. Als natürliche Lösungsvermittler biogenen Ursprungs weisen sie in Form von Vesikeln ein Potential zur Solubilisierung, aber auch zur Mobilisierung lipophiler Substanzen in wäßrigem Milieu auf. Im Bereich der Pedosphäre wird daher bei Anwesenheit von Vesikeln die Mobilisierung lipophiler, wasserunlöslicher Schadstoffe stark begünstigt [13]. Insbesondere persistente Schadstoffe können in die lipophile Doppelschicht von Vesikeln eingelagert und im wäßrigen Milieu im Bereich natürlicher Kompartimente verfrachtet werden. Eine mögliche Folge ist letztendlich die Grundwasserkontamination. Die Solubilisierung in Vesikel erhöht die Bioverfügbarkeit der Schadstoffe aufgrund der verstärkten Mobilität und einer verminderten Sorptionstendenz an der Bodenmatrix. Mögliche Interaktionen mit Organismen eröffnen Anreicherungspfade innerhalb der Nahrungskette, ein noch wenig berücksichtigter Pfad der Bioakkumulation in Organismen. Vesikel sind überdies in der Lage, die menschliche Haut zu permeieren. Bei einem direkten Kontakt kann es daher zu einem verstärkten Eintrag lipophiler Substanzen in die Blutbahn kommen [10]. Aber auch die Möglichkeit der direkten Ingestion in den Säugetierorganismus ist nach Eintrag solubilisierter Schadstoffe in das Trinkwasser über eine orale Applikation nicht auszuschließen.

Aus diesem Grunde soll in diesem Kapitel eine Studie der Interaktion mutagener Substanzen mit natürlichen Zellsystemen vorgestellt werden. Mit Hilfe des Schwesterchromatidenaustausch-Testes (sister chromatide exchange, SCE) wurde hierzu der potentielle Einfluß der Solubilisierung mutagener Substanzen in Liposomen auf deren gentoxische Wirkung untersucht.

6.2 Fremdstoffmetabolismus lipophiler Stoffe in Organismen

Körperfremde, lipophile Substanzen, die von Organismen aufgenommen wurden, zeigen eine Tendenz zur Anreicherung in lipidreichen Geweben und werden in unveränderter Form nur langsam ausgeschieden. Der Organismus verfügt aus diesem Grunde über ein effektives Enzymsystem, welches nach Metabolisierung die Ausscheidung der Stoffe in wasserlöslicher Form ermöglicht. Bei den höheren Organismen ist dieses Enzymsystem vorwiegend in der Leber lokalisiert. Die lipophilen Substanzen werden in **Phase I** mit Hilfe eines Enzymsystems mit breiter Substratspezifität, dem Cytochrom-P450, zu reaktiven, elektrophilen Zwischenprodukten oxidiert und nachfolgend hydrolysiert. Im Anschluß erfolgt in **Phase II** die enzymatische Kopplung der funktionellen Gruppen mit Molekülresten des Intermediärstoffwechsels wie Glutathion, Carbon- oder Aminosäuren zu wasserlöslichen Konjugaten. Diese sind im allgemeinen weniger toxisch als die Ausgangsprodukte und vom Organismus

leicht auszuschleiden. Im Zuge der Metabolisierung ist jedoch auch eine Bioaktivierung von ansonsten wenig toxischen Substanzen möglich. Die Metabolite können durch direkte Reaktion mit funktionell wichtigen Proteinen und Lipiden oder durch kovalente Bindung an der DNS irreversible toxische Wirkungen auslösen. Die Zelle verfügt meist über hinreichende Reparaturmechanismen, die Schäden im Bereich der DNS beheben. Bei schwerwiegenden Defekten kommt es zur Apoptose. Werden diese Defekte nicht erkannt, so können die genetischen Veränderungen nach der Zellteilung in Form von Mutationen manifestiert werden und in der Folge zur Entartung der Zellen führen.

Um Informationen über die toxische Wirkung einer Substanz auf das genetische Material zu erhalten, verwendet man *in-vitro*-Genotoxizitätstests. Diese ermöglichen sowohl eine Abschätzung mutagener Potentiale, als auch die Aufklärung von zugrundeliegenden Wirkmechanismen im Bereich der Gesamtheit der zur Weitergabe der genetischen Information wichtigen Strukturen.

6.3 Schwesterchromatidenaustausch-Test (SCE)

Der Schwesterchromatidenaustausch-Test zählt zu den *in-vitro*-Genotoxizitätstests. Er ist durch die hohe Empfindlichkeit und gute Reproduzierbarkeit im Rahmen von Mutagenitätsprüfungen gekennzeichnet. Unter einem Schwesterchromatidenaustausch versteht man reziproke Austausche homologer DNS-Abschnitte der beiden genetisch identischen Schwesterchromatiden eines Chromosoms. SCE spontaner Natur werden durch den Bruch der Elternstränge an der Replikationsgabel und die reziproke Wiedervereinigung der Tochterstränge erklärt. Demgegenüber stehen SCE, die durch physikalische oder chemische Ursachen aufgrund einer DNS-Schädigung induziert werden. Genaue molekulare Mechanismen der Entstehung von SCE sind jedoch noch nicht bekannt. Der Austausch erfolgt vermutlich in der S-Phase des Zellzyklus während der DNS-Replikation. Aber auch S-Phase-unabhängige SCE-Induktionen sind möglich. Diese werden beispielsweise durch ionisierende Strahlung ausgelöst.

Der Schwesterchromatidenaustausch-Test wird in der Regel unter Verwendung permanenter Zelllinien wie CHO-Zellen (chinese hamster ovary) durchgeführt. Diese werden über einen Zeitraum von 1- 3 Stunden mit der jeweiligen Testsubstanz in Kontakt gebracht. Hierbei kann zusätzlich ein exogenes Metabolisierungssystem wie der S9-Mix, ein Enzymkonzentrat der Rattenleber, verwendet werden. Die Zellen werden über zwei Zellzyklen (DNS-Syntheszyklen) kultiviert, wobei der erste in Gegenwart eines Überschusses von 5-Bromdesoxyuridin (BrdUrd) erfolgt. 5-Bromdesoxyuridin wird als synthetisches Nucleosid aufgrund seiner strukturellen Ähnlichkeit während der DNS-Synthese anstelle der Pyrimidinbase Thymidin (vgl. Abbildung 6-1) in den neu synthetisierten DNS-Strang eingebaut.

Somit liegen nach zwei Zellzyklen Chromosomen mit zwei asymmetrisch BrdUrd-substituierten Chromatiden vor. Die Zugabe des Spindelgiftes *N*-Desacetyl-*N*-methylcolchicin (Colcemid) ermöglicht die Arretierung der Zellen in der Metaphase, in der die Chromosomen in kondensierter Form vorliegen. Durch differentielle Färbung mit Bisbenzimid (Hoechst 33258), einem Fluoreszenzfarbstoff, und anschließender Giemsa-Färbung werden nun selektiv die thymidinreichen Bereiche der Chromosomen markiert.

Auf diese Weise entstehen Chromosomen, die jeweils zwei asymmetrisch mit BrdUrd substituierte Chromatiden (Abbildung 6-2) aufweisen und mikroskopisch nachgewiesen werden können.

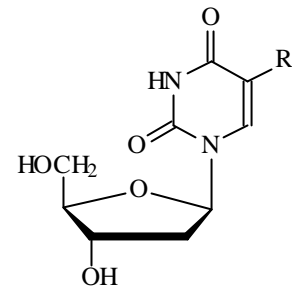


Abbildung 6-1: Vergleich der Nucleosidstruktur von Thymidin ($R = \text{CH}_3$) und 5-Bromdesoxyuridin ($R = \text{Br}$).

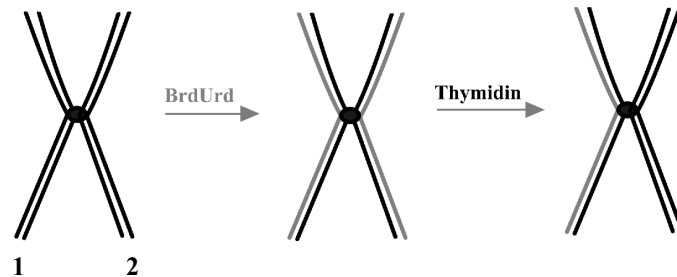


Abbildung 6-2: Schematische Darstellung des BrdUrd-Einbaus zur Erzeugung unterschiedlich substituerter Chromatiden. Die Abbildung zeigt ein kondensiertes Eukaryonten-Chromosom mit den beiden Schwesterchromatiden (1 und 2), die über das Zentromer (●) verbunden sind. Nach der ersten Replikation in Gegenwart von BrdUrd entstehen Metaphasechromosomen mit zwei symmetrisch substituierten Schwesterchromatiden. Nach einer weiteren Replikation in Abwesenheit von BrdUrd resultieren zwei asymmetrisch mit BrdUrd substituierte Chromatiden, wobei eine Chromatide unifilar und eine Chromatide unsubstituiert vorliegt.

Treten nun SCE auf, so sind diese durch Farbwechsel zwischen beiden Chromatiden zu erkennen (Abbildung 6-3). Eine Quantifizierung erfolgt über die Ermittlung der Häufigkeit eines Farbwechsels innerhalb des Chromosoms.

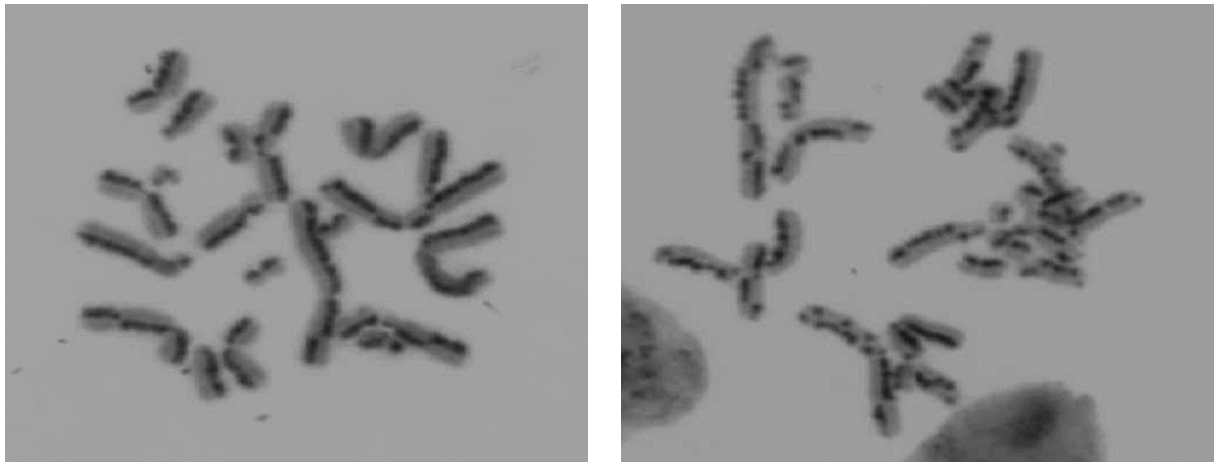


Abbildung 6-3: Mikroskopische Aufnahme des Schwesterchromatidenaustausches in Metaphasechromosomen von CHO-Zellen nach differentieller Färbung.

- a) Kontrollexperiment mit wenigen SCE.
- b) Chromosomen nach Einwirkung mutagener Substanzen. Die zahlreichen Schwesterchromatidenaustausche sind deutlich aufgrund des reziproken Färbemusters der „Harlekinchromosomen“ zu erkennen.

6.4 Einfluß von Vesikeln auf die Gentoxizität

Der Einfluß der Solubilisierung einer mutagenen Substanz im lipophilen Bereich von Vesikeln sollte im Hinblick auf gentoxische Eigenschaften unter Verwendung des SCE-Tests untersucht werden. Hierzu wurden mäßig bis schlecht wasserlösliche lipophile Substanzen eingesetzt und deren mutagenes Potential in molekular gelöster Form mit dem des solubiliert vorliegenden Schadstoffes verglichen. Es galt eine Abschätzung vorzunehmen, ob durch die Solubilisierung eines lipophilen Schadstoffs in Vesikeln dessen mutagenes Potential beeinflusst wird.

Denkbar ist sowohl eine negative, als auch eine positive Beeinflussung. Eine Abschwächung der Genotoxizität wäre eine logische Konsequenz der Einlagerung des Mutagens in den lipophilen Doppelschichtbereich der Vesikel, die wiederum zu einer deutlichen Reduktion der Konzentration des Schadstoffs in der wäßrigen Phase führt. So konnte gezeigt werden, daß der akut toxische Effekt von Pyren auf marine Organismen durch Zugabe von organischem Humus aufgrund der Sorption des Polyaromaten und der daraus resultierenden Erniedrigung der Bioverfügbarkeit, deutlich reduziert werden kann. Eine positive Beeinflussung ist hingegen bei der Interaktion der Vesikel mit der zellulären Matrix zu erwarten, wodurch es zu sehr hohen lokalen Konzentrationen des Mutagens im Zellbereich kommen sollte. *In-vitro*-Untersuchung an Rattenleberzellen RL-19 stehen jedoch scheinbar im Widerspruch mit den angeführten Überlegungen, da keinerlei Beeinflussung der gentoxischen

Wirkung durch die Solubilisierung wasserunlöslicher Substanzen wie Benzo[a]pyren in Vesikeln beobachtet werden konnte [149]. Aus diesem Grunde werden im folgenden Untersuchungen unter Verwendung des SCE-Testes vorgestellt, wobei ausschließlich Substanzen mit bekanntem mutagenen Potential eingesetzt wurden. Verglichen wurde das jeweilige mutagene Potential der molekular in der Wasserphase gelösten mit der in Vesikeln solubilierten Spezies. Alle verwendeten Konzentrationen lagen hierbei innerhalb der Wasserlöslichkeit des Mutagens.

6.4.1 Experimentelle Untersuchungen

Die für die Routinetests eingesetzte CHO-Zelllinie verfügt nicht über ein hinreichend aktives, zur Oxidation befähigtes Metabolisierungssystem wie beispielsweise Rattenleberzellen. Unpolare Verbindungen wie Styrol zeigen daher *in-vitro* keinerlei SCE-Induktionen [150]. Styrol wird intrazellulär nicht metabolisiert und weist per se keine gentoxische Wirkung auf. Auch in Anwesenheit von in großen Vesikeln solubiliertem Styrol können keine Unterschiede zu den jeweiligen Kontrollexperimenten beobachtet werden (vgl. Abbildung 6-4).

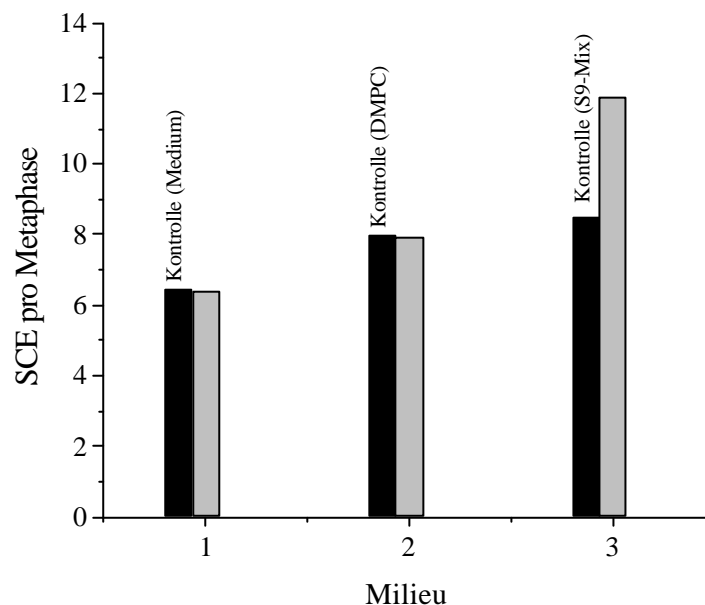


Abbildung 6-4: SCE-Häufigkeit in CHO-Zellen unter dem Einfluß von Styrol ($c = 1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) in wäßriger Lösung und Styrol ($c = 1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) solubilisiert in großen unilamellaren DMPC-Vesikeln ($c = 5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$). Ausgewertet wurden jeweils 50 Metaphasen. Bei Anwesenheit eines exogenen Metabolisierungssystems ist ein deutlicher Anstieg der SCE-Frequenz beobachtbar.

Erst unter dem Einfluß eines exogenen Metabolisierungssystems, dem S9-Mix, kommt es zu einem deutlichen Anstieg der SCE-Frequenz. Grund hierfür ist die enzymatische Oxidation von Styrol zu elektrophilem 1-Phenyl-1,2-epoxyethan. Dieses kann nukleophil an die

DNS addiert oder konkurrierend in Phenylglycol transformiert und in Form von Glucoriniden ausgeschieden werden [150]. Tritt eine Inhibierung der Epoxid-Hydrase auf, so wird vermutlich die Phase-II-Metabolisierung zu nicht mutagenem 1-Phenyl-1,2-dihydroxyethan gehemmt und die Reaktion mit der DNS begünstigt [150]. Weiterhin ist ein oxidativer Abbau von Styrol zu Benzoessäure möglich [132].

Zudem zeigt Abbildung 6-4 anhand der Kontrollexperimente, daß selbst bei Abwesenheit eines Mutagens SCE beobachtet werden. Die Substitution des Thymidin durch BrdUrd führt innerhalb der Chromosomen per se zu einer Erhöhung der SCE-Frequenz [151]. Grund hierfür sind Radikalreaktionen, die durch die Abspaltung eines Bromradikals ausgelöst werden und SCE induzieren können. Aus diesem Grunde sind Kontrollexperimente unerlässlich.

Bei Abwesenheit einer mutagenen Substanz ist eine Erhöhung der SCE-Frequenz allein durch die Präsenz der Vesikel zu beobachten. Abbildung 6-5 verdeutlicht die Konzentrationsabhängigkeit dieser Induktion. Da die molekulare Löslichkeit von DMPC vernachlässigbar klein ist, kann dies als deutlicher Hinweis auf eine Interaktion der Vesikel mit den CHO-Zelle gewertet werden.

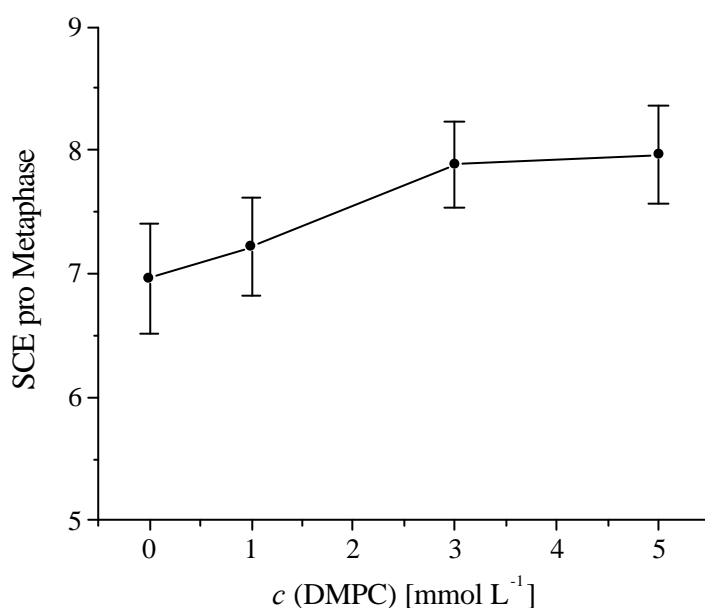


Abbildung 6-5: Konzentrationsabhängige SCE-Induktion unter dem Einfluß großer unilamellarer DMPC-Vesikel (LUV) in Abwesenheit mutagener Substanzen. Die Balken bezeichnen den Standardfehler des Mittelwertes von jeweils 50 untersuchten Metaphasen.

Die Induktion der SCE erfolgt in diesem Falle vermutlich auf indirektem Wege durch einen verstärkten Einbau vesikulärer Lipide in die Plasmamembran. Hierdurch wird der Ordnungszustand der Membran gestört, ein Vorgang, der nachfolgend die Integrität der Plasmamembran und der hierin verankerten Membranproteine in ihrer Funktion deutlich beeinträchtigen kann [132]. Eine veränderte Permeabilität sowie Aktivität wichtiger Enzymsy-

steme aufgrund einer veränderten Zusammensetzung der Plasmamembran sind die Folge [6]. Erfolgt hierdurch eine Beeinträchtigung der zur exakten Replikation notwendigen Zellfunktionen, oder den Reparaturenzymen, so wird eine Erhöhung der SCE möglich.

Da der verwendete Zelltyp über ein sehr eingeschränktes Metabolisierungssystem verfügt, wurden nachfolgende Versuche mit reaktiven Spezies wie beispielsweise Phase-I-Metaboliten durchgeführt. Verglichen wurde wiederum die Wirkung des Mutagens in wäßriger Lösung mit derjenigen der, im lipophilen Membranbereich von Vesikeln, solubilierten Substanz. Die eingesetzten Mutagene können aufgrund ihrer unterschiedlichen Wirkungsweise und Wasserlöslichkeit klassifiziert werden. Benzylchlorid [152] mit einer Wasserlöslichkeit von $0.50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ [132] und Ethylmethansulfonat ($50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) [153] schädigen die DNS durch Alkylierung, bzw. Benzylierung. 1-Phenyl-1,2-epoxypropan kann nukleophil an die Basen der DNS addiert werden [154]. Aber auch eine indirekte Induktion von SCE durch Inhibition von Enzymen, die an der DNS-Reparatur beteiligt sind, ist möglich. So bewirkt 3-Aminobenzamid eine Hemmung der Poly(ADP-ribose)polymerase, die an der Exzisionsreparatur in Säugetierzellen beteiligt ist. Diese Inhibierung führt zu einer Anhäufung unreparierter Stellen in der DNS, die während der S-Phase des Zellzyklus zu SCE führen können [155]. Die Ergebnisse der Untersuchungen sind in Abbildung 6-6 dargestellt.

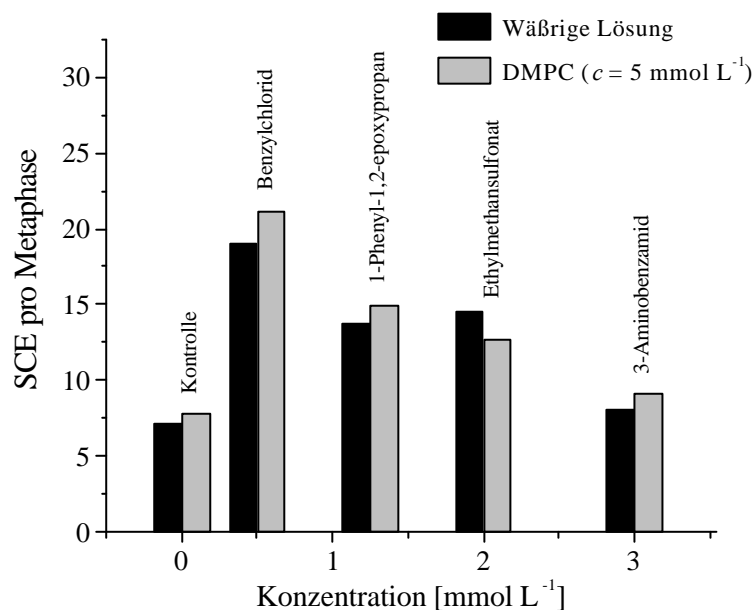


Abbildung 6-6: Vergleich der SCE-Häufigkeit in CHO-Zellen nach Einwirkung unterschiedlicher Mutagene jeweils in wäßriger Lösung und in großen unilamellaren DMPC-Vesikeln (LUV) solubiliert. Die Substanzen wurden in unterschiedlichen Konzentrationen entsprechend Literaturdaten [152, 154, 156, 157] eingesetzt.

Auffällig zeigt sich bei dem Vergleich der Effektivität der SCE-Induktionen (Abbildung 6-6), daß bei der Verwendung von solubilisierten Mutagenen in großen Vesikeln in fast allen Fällen eine geringfügige Erhöhung zu beobachten ist. Einzig im Falle des Ethylmethansulfonat wird ein gegensätzlicher Effekt beobachtet. Dieser läßt sich jedoch gut mit der um einem Faktor 100 höheren Wasserlöslichkeit im Vergleich zu dem in der Wirkungsweise ähnlichen Benzylchlorid erklären.

In Abbildung 6-7 ist die vergleichende Untersuchung in Form einer dosisabhängigen SCE-Induktion am Beispiel von 1-Phenyl-1,2-epoxypropan dargestellt. Diese läßt eine leichte dosisabhängige Erhöhung geschädigter Metaphasen nach Solubilisierung des Metabolits in Phospholipidvesikeln im Vergleich zum nicht solubilisierten Mutagen erkennen. Diese ist jedoch nicht statistisch signifikant.

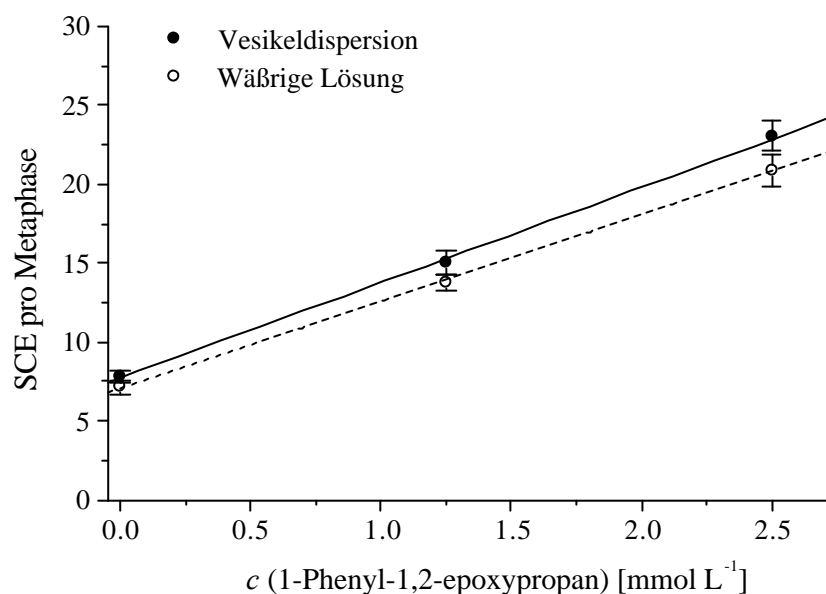
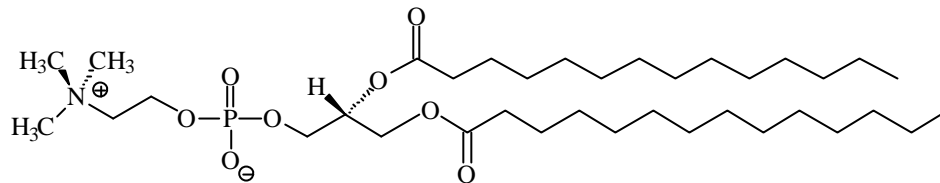


Abbildung 6-7: SCE-Induktion durch in Vesikeln solubilisiertes (●) und nicht solubilisiertes (○) 1-Phenyl-1,2-epoxypropan. Die letale Dosis konnte in beiden Fällen bei einer Konzentration von $3.75 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ermittelt werden. Die Balken repräsentieren den Fehler des Mittelwertes.

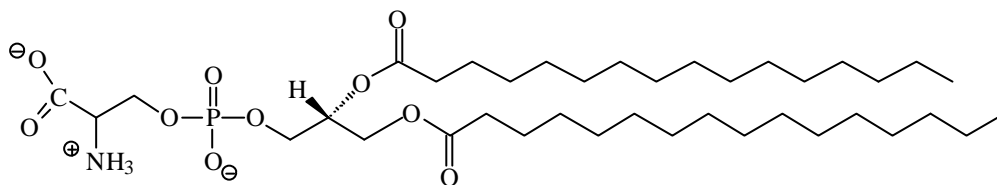
6.4.2 Einfluß der Oberflächenladung auf die Vesikel-Zell-Interaktion

Die Oberflächenladung von Vesikeln kann den Mechanismus der Wechselwirkung mit Zellen dirigieren. So konnte nachgewiesen werden, daß negativ geladene Vesikel über Prozesse der Endocytose ins Zellinnere gelangen [158]. Aus diesem Grund wurde ein möglicher Einfluß der Oberflächenladung der Vesikel auf die Induktion von Schwesterchromatidenaustauschen in CHO-Zellen unter Verwendung von solubilisiertem 1-Phenyl-1,2-epoxypropan analysiert.

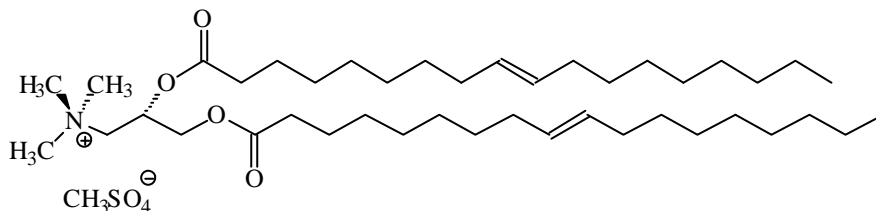
Neben dem bei $\text{pH} = 7$ zwitterionischen DMPC wurden aus diesem Grunde zusätzlich äquimolare Gemische von DMPC mit geladenen Lipiden (vgl. Abbildung 6-8) verwendet. Auf die Verwendung einkettiger kationischer Tenside wurde verzichtet, da diese eine wesentlich höhere Cytotoxizität aufweisen als vergleichbare zweikettige [11]. Somit wurde auf DOTAP (vgl. Abbildung 6-8) zurückgegriffen. Dieses Amphiphil findet Anwendung in der liposomen-vermittelten Transfektion, dem Einschleusen von Polynucleotiden in lebende Zellen.



1,2-Dimyristoylphosphatidylcholin (DMPC)



1,2-Dipalmitoylphosphatidylserin (DPPS)



N-[1-(2,3-dioleoyloxy)propyl]-*N,N,N*-trimethylammoniummethylsulfat (DOTAP)

Abbildung 6-8: Vergleich der verwendeten Amphiphile unterschiedlicher Ladung.

Ein signifikanter Einfluß der Oberflächenladung großer Vesikel (LUV) auf die beobachtete SCE-Frequenz konnte jedoch bei Anwesenheit von solubilisiertem 1-Phenyl-1,2-epoxypropan nicht beobachtet werden (vgl. Abbildung 6-9).

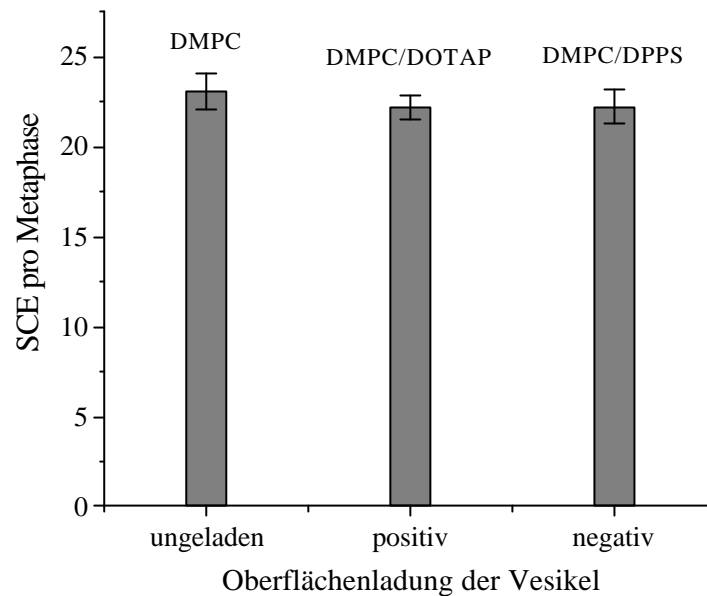


Abbildung 6-9: Einfluß der Oberflächenladung großer unilamellarer Vesikel ($c = 5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) auf die SCE-Induktion durch solubilisiertes 1-Phenyl-1,2-epoxypropan ($c = 2.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$).

6.4.3 Einfluß der Vesikelgröße auf die Vesikel/Zell-Interaktion

Die Größe der verwendeten Vesikel zeigt keinerlei Einfluß auf die SCE-Induktion in Abwesenheit einer mutagenen Substanz (Daten nicht aufgeführt). Auffällig ist jedoch die Erhöhung der SCE-Frequenz in Anwesenheit eines Mutagens (Abbildung 6-10) bei Verwendung kleiner unilamellarer Vesikel. Diese ist sowohl im Vergleich zur wäßrigen Lösung des Mutagens, als auch gegenüber der Verwendung großer Vesikel signifikant.

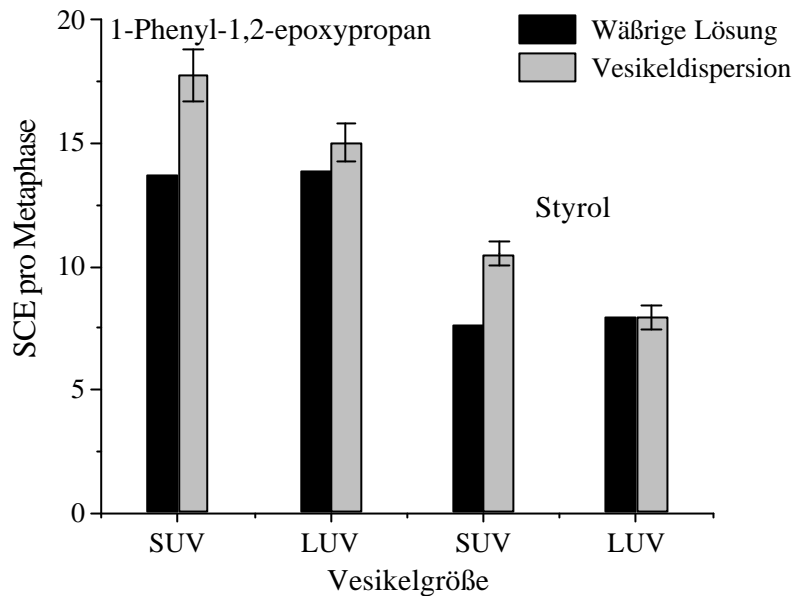


Abbildung 6-10: Einfluß der Vesikelgröße auf die SCE-Induktion durch solubilisier-tes 1-Phenyl-1,2-epoxypropan ($c = 1.25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) und Styrol ($c = 1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) in kleinen (SUV) und großen Vesikeln (LUV). Zum Vergleich sind die jeweiligen SCE-Häufigkeiten des im phospholipidfreien Medium gelösten Mutagens gleicher Konzentration angeführt.

Die beobachteten Unterschiede der SCE-Induktion kleiner ($d < 40 \text{ nm}$) und großer Vesikel ($d \approx 100 \text{ nm}$) sind innerhalb einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % signifikant. Bei gleicher Konzentration des solubilisierten Mutagens bewirken kleine Vesikel (SUV) somit eine effektivere Erhöhung des mutagenen Potentials gegenüber großen Vesikeln (LUV). Desweiteren zeigen selbst mit Styrol beladene, kleine unilamellare Vesikel eine deutliche Induktion von SCE bis zu Werten von 10.2 SCE pro Zelle (Abbildung 6-10). Die Ergebnisse der Untersuchungen weisen jedoch in diesem Fall eine schlechte Reproduzierbarkeit auf. Insbesondere direkt nach der Vesikelbeladung eingesetzte Dispersionen induzieren vergleichbar mehr SCE.

Je nach Vesikelgröße liegen somit vermutlich unterschiedliche Mechanismen der Interaktion von Vesikel und Zelle vor, die im folgenden detailliert betrachtet werden.

Die Tatsache, daß die SCE-Induktion mäßig wasserlöslicher Mutagene nur unwesentlich davon abhängt, ob die Substanz molekular gelöst, oder in Vesikeln solubilisiert vorliegt, ist zunächst überraschend. Dies deutet darauf hin, daß der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Induktion der SCE im Zellinneren lokalisiert ist. Die Komplexität des Systems erschwert jedoch eine exakte, detaillierte Aussage über potentielle Mechanismen. In Abbildung 6-11 sind mögliche Interaktionen von Vesikeln mit einer Zelle dargestellt, die aufgrund ihrer unterschiedlichen Mechanismen des Eintrags einer solubilisierten lipophilen Substanz in das Cytoplasma differenziert werden können.

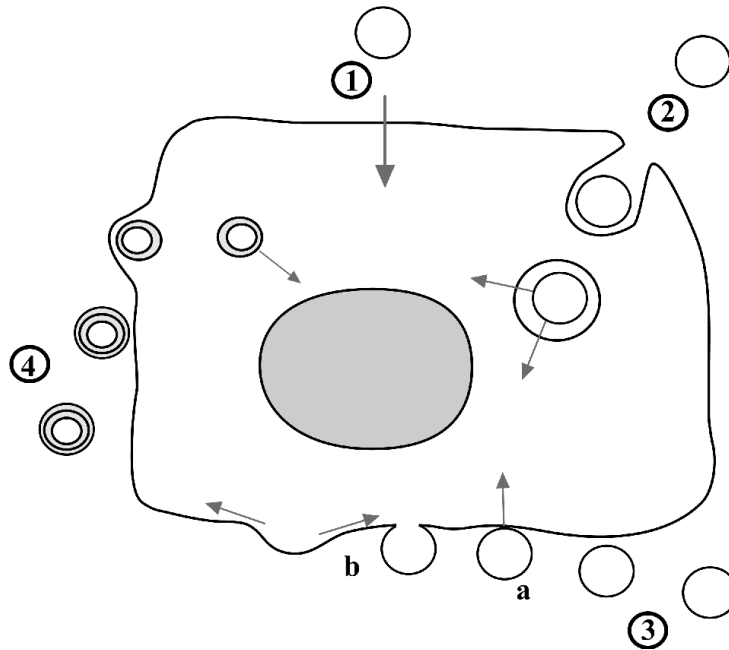


Abbildung 6-11: Schematische Darstellung möglicher Interaktionen schadstoffbelasteter Vesikel mit kultivierten Zellen.

1. Diffusion der lipophilen Substanz über die Wasserphase durch die Zellmembran.
2. Endocytose unilamellarer Vesikel und anschließende Auflösung der Vesikel durch lysosomale Enzyme nach Wechselwirkung mit Lysosomen.
3. Diffusion unilamellarer Vesikel zur Plasmamembran und
 - a) Adhäsion unter Freisetzung der lipophilen Substanz in hoher Konzentration im Bereich der Zelloberfläche und anschließendem Eintrag des Mutagens in Bereiche der Plasmamembran sowie ins Cytosol.
 - b) Fusion mit der Plasmamembran unter Assimilation der Komponenten der Vesikelmembran.
4. Fusion multilamellarer Vesikel mit der Plasmamembran unter Eintrag innerer Lamellenstrukturen ins Cytosol.

Die Untersuchungen in Abwesenheit eines Mutagens zeigen, daß eine Wechselwirkung großer unilamellarer Vesikel mit der Zelle vermutlich nach Adsorption unter Einbau vesikulärer Lipide in die Plasmamembran erfolgt (Schritt 3a in Abbildung 6-11). Direkte Fusionen mit der Plasmamembran (Schritt 3b) werden im Falle großer Vesikel kaum beobachtet [2]. In Gegenwart einer lipophilen mutagenen Substanz sollten beim Auftreten adsorbierter Vesikel lokal hohe Dosen des Mutagens freigesetzt werden. Diese können nahezu ungehindert durch die Plasmamembran diffundieren und gelangen somit in das Zellinnere und letztendlich zum Zellkern, wobei im Cytoplasma eine starke Verdünnung erfolgt. Falls die Dispersionen aufgrund ihrer Präparation auch multilamellare Vesikel aufweisen, gelangen hierbei die inneren Lamellen direkt ins Cytosol (Schritt 4).

Die Wechselwirkung kleiner unilamellarer Vesikel (SUV) mit der Plasmamembran unterscheidet sich vermutlich von der großer (LUV).

Kleine unilamellare Vesikel weisen eine vergleichsweise hohe Brown'sche Dynamik auf. Sie können vermutlich sterische Barrieren wie die Glykokalix nahezu ungehindert überwinden und interagieren statistisch häufiger mit der Plasmamembran. Aber nicht nur die Größe, sondern auch die im Vergleich zu großen Vesikeln abweichenden Eigenschaften sollten das Verhalten entscheidend dominieren. Die diskutierten hohen Krümmungen führen innerhalb kleiner Vesikel zu hohen Membranspannung. Dies verstärkt deutlich die Neigung zu Fusionen, insbesondere mit der Plasmamembran. Ferner zeigen diese hochgespannten Aggregate kaum noch thermisch bedingte Undulationen, die im Falle großer Vesikel als abstoßende Kräfte bei der Annäherung an Oberflächen wirken.

Im Falle kleiner Vesikel existieren eine Reihe von zum Teil widersprüchlichen Hinweisen auf eine Vesikel/Zell-Interaktion in Form einer verstärkten Fusion der Vesikel mit der Zellmembran [159] sowie auf das Eindringen der Vesikel mittels Endocytose [160]. Dies zeigen beispielsweise Untersuchungen unter Verwendung von wasserlöslichem Carboxyfluorescein [159]. Die Fluoreszenz von Carboxyfluorescein wird im wässrigen inneren Kompartiment kleiner Vesikel aufgrund der hohen lokalen Konzentration gequenchet. Die Wechselwirkung mit Zellen führt zur Freisetzung von Carboxyfluorescein ins Cytosol und zum Auftreten einer Fluoreszenz aufgrund des Verdünnungseffektes. Hiermit läßt sich jedoch nicht eindeutig klären, ob die Fusion der Vesikel mit der Plasmamembran der Zellen (Schritt 3b) als passiver Mechanismus auftritt oder ein Einschleusen der Vesikel via Endocytose (Schritt 2) erfolgt. Letztgenannter Mechanismus wird im Falle kleiner Vesikel oftmals diskutiert. Die Endocytose ist bei kleinen Vesikeln im Gegensatz zu großen möglich. Der Grund hierfür liegt im eigentlichen Aufbau der Plasmamembran begründet. Auf der Innenseite der Lipiddoppelschicht ist ein Polymernetzwerk, das sogenannte Cytoskelett verankert, welches die elastischen Eigenschaften der Membran maßgeblich bestimmt. Um ein Vesikel zu phagocytieren, muß die Plasmamembran gekrümmt werden (vgl. Schritt 2 in Abbildung 6-11). Dies ist jedoch nur bis zu einer bestimmten Vesikelgröße möglich, da oberhalb einer Größe von etwa 100 nm die Maschengröße des Cytoskeletts limitierend wirkt. Aus diesem Grund gelangen vermutlich nur sehr kleine Vesikel in die Zelle, wobei diese nach Eindringen ins Zellinnere in der Regel mit Lysosomen verschmelzen. Die lysosomalen Enzyme bewirken einen schnellen interzellulären Abbau der Vesikel unter Freisetzung der solubilisierten mutagenen Substanzen. Ferner können nicht mutagene Substanzen während des Abbauprozesses metabolisiert werden. Letztendlich erfolgt somit ein effektiver Eintrag der reaktiven Spezies ins Cytosol, woraus eine erhöhte Wahrscheinlichkeit der Reaktion mit der Erbsubstanz resultiert. Das Eindringen kleiner unilamellarer Vesikel in die Zelle sowie die verstärkte Fusion mit der Plasmamembran ist folglich eine Erklärung für die in Abbildung 6-10 gezeigte Abhängigkeit der SCE-Induktion von der Vesikelgröße.

6.5 Zusammenfassung

Zusammenfassend kann angeführt werden, daß unter dem Einfluß von DMPC-Vesikeln in Abwesenheit eines Mutagens eine Erhöhung der SCE-Frequenz bei CHO-Zellen als Folge der Vesikel/Zell-Interaktion zu beobachten ist. Diese Erhöhung führt bei Verwendung großer unilamellarer Vesikel vermutlich zu einer Beeinträchtigung der Funktion membrangebundener Enzymsysteme.

Die Solubilisierung eines lipophilen Mutagens in großen Vesikeln hat keinen signifikanten Einfluß auf die Frequenz induzierter Schwesterchromatidenaustausche für Konzentrationen innerhalb der Wasserlöslichkeit der Substanz. Eine erhöhte Anzahl SCE kann jedoch nach Solubilisierung in kleinen Vesikeln beobachtet werden, die aufgrund ihrer Größe und strukturellen Eigenschaften effektiver *in-vitro* mit CHO-Zellen interagieren und vermutlich über die Phagocytose direkt ins Zellinnere gelangen.

7 Anwendungsbeispiele vesikulärer Systeme

Im folgenden Kapitel soll exemplarisch auf die Bedeutung von Vesikeln im Bereich der supramolekularen Chemie und der Kolloidwissenschaft im Hinblick auf potentielle Anwendungen eingegangen werden. Der erste Teil widmet sich zunächst einem Weg, der zur reversiblen Änderung der Morphologie von Vesikeln führt und zeigt somit eine Möglichkeit zur Herstellung schaltbarer vesikulärer Systeme auf. Der zweite Teil beschäftigt sich mit der Verwendung von Vesikeln als Templat zur radikalischen Polymerisation lipophiler Solubilisate und erläutert die Problematik bei der Erzeugung von Kapselmaterialien.

7.1 Wege zu morphologisch schaltbaren vesikulären Strukturen

Der Einfluß eines Solubilisats auf die Eigenschaften der Doppelschicht von Vesikeln ist, wie bereits ausführlich diskutiert, von der Molekülgröße, aber auch von Faktoren wie der Polarität und somit der Affinität des Solubilisats zum Kopfgruppenbereich abhängig. In Betracht der Tatsache, daß die Doppelschicht als ein zweidimensionales Lösungsmittel geometrischen Restriktionen unterliegt, wird deutlich, daß die Geometrie und der Raumbedarf des Solubilisats sowie die Kompatibilität mit der Doppelschicht einen entscheidenden Einfluß auf die Solubilisierbarkeit hat. Entsprechend sinkt das Solubilisierungsvermögen mit steigender Molekülgröße. Das Maximum der Solubilisierungskapazität für grenzflächenaktive Substanzen wie Cholesterin liegt in Phosphatidylcholinvesikeln bei 66 Mol-% entsprechend einem Molverhältnis von 2:1, wobei oberhalb von 50 Mol-% Entmischungen unter Bildung von phasensepariertem Cholesterin auftreten [161]. Große lipophile Moleküle wie Pyren weisen mit etwa 10 - 20 Mol-% eine wesentlich geringere Löslichkeit in DMPC-Vesikeln auf.

Eine Fluktuationsanalyse von DMPC-Vesikeln nach Solubilisierung von 10 Mol-% Pyren zeigt mit $k_c = 0.8 \cdot 10^{-19}$ J eine deutlich erniedrigte Biegesteifigkeit. Die hierzu nötige Toluolmenge liegt bei 85 Mol-% (Tabelle 7-2). Dies zeigt den auffallend höheren Einfluß von Pyren auf die elastischen Eigenschaften von DMPC-Vesikeln.

Tabelle 7-2: Vergleich des Einflusses lipophiler Substanzen auf den Modul der Biegesteifigkeit von DMPC-Vesikeln.

System	Mol-% Solubilisat	k_c [10^{-19} J]
DMPC		1.4 ± 0.2
DMPC/Pyren	10	0.8 ± 0.1
DMPC/Pyren	10	1.1 ± 0.2 *
DMPC/Toluol	85	0.8 ± 0.1

(* bei UV-Bestrahlung)

Auf der Grundlage der Erkenntnisse der Solubilisierung lipophiler Substanzen soll im folgenden ein Konzept zur morphologischen Beeinflussung vesikulärer Systeme vorgestellt werden. Es beruht auf der Beeinflussung des Gleichgewichts zwischen lipophilem Solubilisat und dem Amphiphil, wodurch letztendlich eine strukturelle Änderung der Aggregatgestalt erfolgt.

7.1.1 Morphologisch schaltbare Systeme auf der Basis lipophiler Solubilisate

Die Gestalt fluiden Vesikel wird neben der Krümmungsenergie durch ein konstantes Verhältnis von Membranfläche und dem eingeschlossenen wässrigen Volumen bestimmt. Eine Änderung der Fläche der Doppelschicht führt bei konstantem inneren Volumen zu einer Gestaltänderung, ein Effekt der beispielsweise bei Änderungen der Temperatur auftritt. Ferner wird eine Gestaltänderung durch Variation der spontanen Krümmung der Doppelschicht möglich [162].

Lipophile Solubilisate beeinflussen den effektiven Packungsparameter des Amphiphils. Auf der Basis dieser Modellvorstellung sollte es möglich sein, durch Modifikation der Solubilisateigenschaften eine Änderung der Vesikelgeometrie zu erzwingen. Eine Möglichkeit der irreversiblen Variation des Solubilisats liefern chemische Reaktionen, die beispielsweise in Form von Polymerisationen zu einer Gestaltänderung führen und im nächsten Abschnitt behandelt werden. Interessant ist zudem die Erzeugung von Nichtgleichgewichtszuständen, aus denen das System in die jeweilige Ausgangslage relaxieren kann und die somit zu einer reversiblen Änderung der Vesikelgestalt führt. Auf diese Weise dürfte die Konstruktion morphologisch schaltbarer, supramolekularer Aggregate in einem breiten Größenbereich möglich sein. Wie aber lassen sich derartige Nichtgleichgewichtszustände auf der Basis lipophiler Solubilisate erzeugen und reversibel beeinflussen?

Zur Beantwortung dieser Frage wurde das bereits vorgestellte System Pyren/DMPC näher untersucht. Pyren zeigt, wie bereits beschrieben, nach Anregung im UV-Bereich sowohl eine Monomerfluoreszenz, als auch in hoher Konzentration eine bathochrom verschobene Excimerfluoreszenz.

Pyren wurde zunächst in Konzentrationen nahe der maximalen Solubilisierungskapazität in die Doppelschicht von DMPC eingelagert. Die somit erzeugte Dispersion zeigt eine ausgeprägte Tendenz zur Ausbildung tubusförmiger vesikulärer Strukturen. Mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie ist es möglich, eine UV-Anregung des solubilisierten Pyrens unter gleichzeitiger lichtmikroskopischer Beobachtung der morphologischen Veränderung der Vesikel-Strukturen vorzunehmen. Hierbei zeigt sich nach einer kurzen Initiierungsphase eine deutliche Änderung der Morphologie, die abhängig von der Intensität und Dauer der Einstrahlung ist.

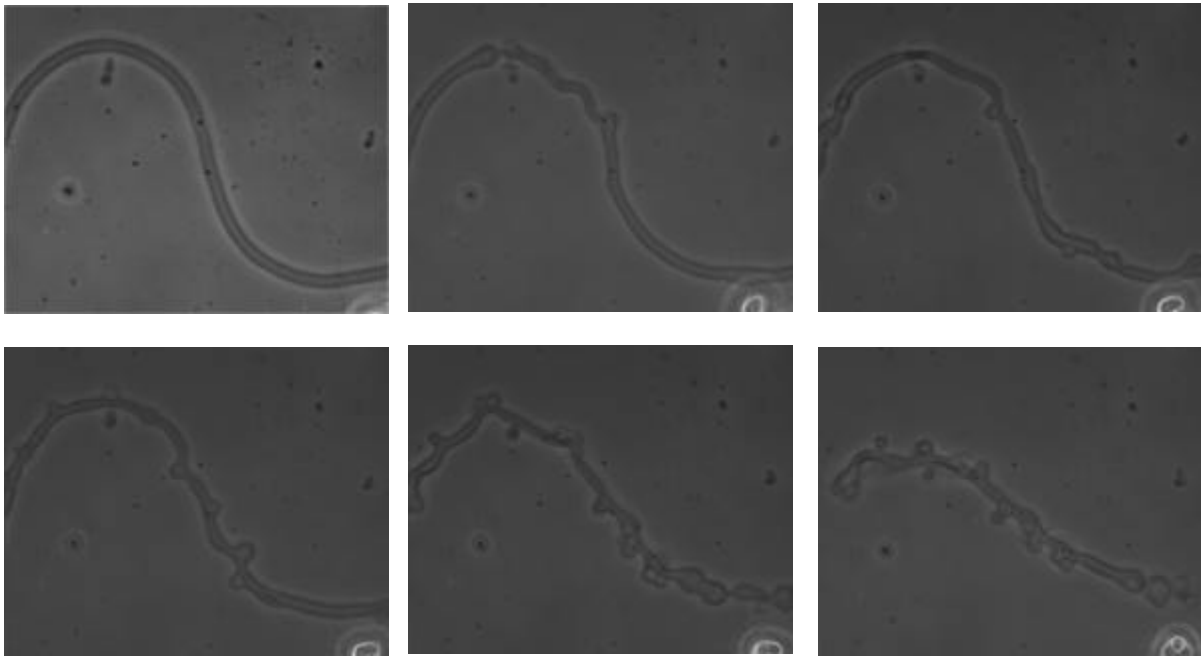


Abbildung 7-1: Morphologische Veränderung einer tubusförmigen Doppelschichtstruktur ($r = 1.5 \mu\text{m}$) von DMPC mit 10 Mol-% Pyren bei permanenter UV-Anregung ($I_{\text{Anr.}} = 330 - 385 \text{ nm}$). Die Bildfolge der ersten drei Bilder entspricht einem Zeitraum von jeweils 0.5 s; zwischen den folgenden beträgt das Intervall 2 s.

Abbildung 7-1 zeigt die morphologischen Änderungen tubusförmiger Doppelschichtstrukturen von DMPC/Pyren bei UV-Anregung. Die Bildfolge verdeutlicht die Änderung der Krümmung der Membran. Ein Vergleich mit unbeladenen oder toluolbeladenen Vesikeln zeigt demgegenüber keinerlei morphologische Beeinflussung im Verlauf der Bestrahlung.

Eine mögliche Erklärung dieses Phänomens ist die lokale Temperaturerhöhung aufgrund strahlungsloser Desaktivierung des Chromophors. Dieser Effekt wird nach Laseranregung chromophorbeladener Vesikel vermutet [163] und kann zur Lyse kleiner Vesikel verwendet werden. Da sich jedoch offensichtlich die Krümmungseigenschaften der Doppelschicht deutlich ändern, sollte der Temperatureinfluß nicht die dominante Triebkraft der Gestaltänderung sein. Zur Aufklärung möglicher Ursachen wurde dieses Phänomen im Detail studiert.

7.1.2 Perlenkettenbildung zylindrischer Vesikel

Die Reduktion der UV-Strahlung auf eine pulsformige Anregung bewirkt eine Antwort des tubusförmigen Systems in Form der Propagation einer peristaltischen Welle, die sich über den Tubus ausbreitet. Nach Beendigung der Bestrahlung erfolgt eine schnelle Relaxation. Bei längerer Bestrahlung kann in einigen Fällen die Bildung einer sogenannten Perlenkette (Abbildung 7-2) beobachtet werden.

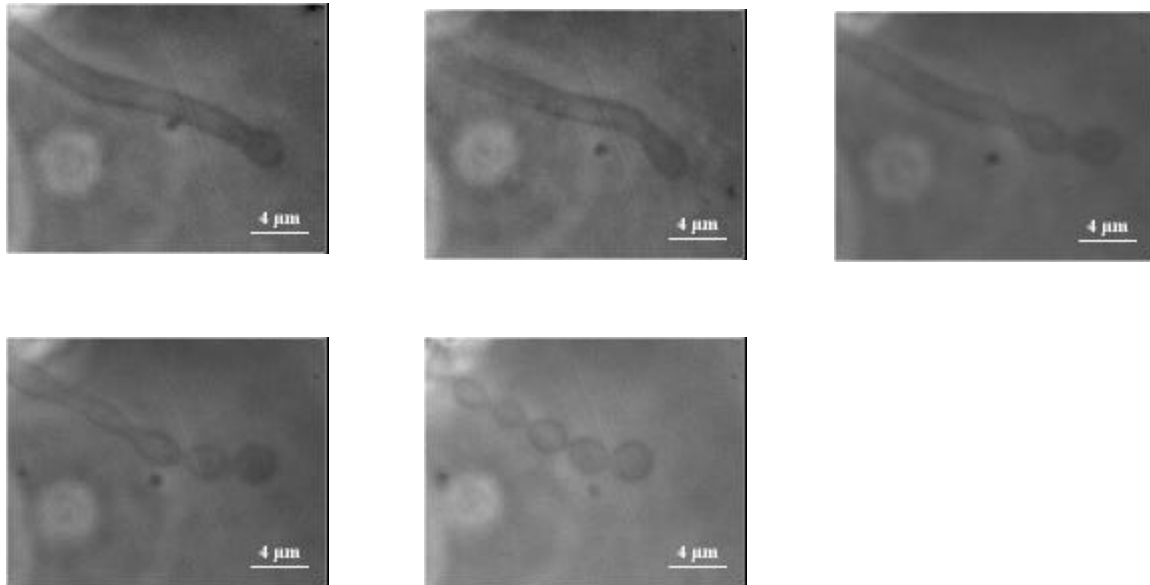


Abbildung 7-2: Perlenkettenbildung einer tubusförmigen vesikulären Struktur von DMPC/Pyren (10 Mol-%) nach UV-Bestrahlung ($I_{\text{Anr.}} = 330 - 385 \text{ nm}$). Im linken oberen Bereich des Tubus existiert ein Reservoir von DMPC, aus dem der Tubus gequollen ist. Nach UV-Bestrahlung erfolgt die Ausbreitung einer peristaltischen Welle über den Tubus. Dieser Prozess ist zunächst reversibel und liefert erst nach längerer Bestrahlung eine stabile Perlenkettenanordnung. Der Radienvergleich zeigt eine höhere mittlere Krümmung H der Perlenkette $r_p = 1.1 \text{ µm}$, $H = 0.9 \text{ µm}^{-1}$ im Vergleich zu der des Zylinders $r_z = 0.7 \text{ µm}$, $H = 0.7 \text{ µm}^{-1}$.

Dieses Phänomen, die sogenannte Perlenketten-Instabilität, zeigt eine deutliche Analogie zu den Beobachtungen der Gestaltumwandlung bei Verwendung eines Lasers als optische Pinzette [164]. Der dielektrische Effekt des Lasers führt zur Anreicherung von Lipidmolekülen im Fokus und bewirkt die Ausbildung einer lateralen Spannung im Membranbereich in der Größenordnung von $1 \cdot 10^{-5} \text{ N} \cdot \text{m}^{-1}$ [3]. Der geringfügige Verlust an effektiver Membranfläche bei konstantem inneren Volumen ist vermutlich die Ursache für die Ausbildung einer peristaltischen Welle entlang des Tubus. Hierdurch erfolgt letztendlich die in Abbildung 7-3 dargestellte Gestaltänderung von der zylindrischen in eine perlenkettenartige Form [164].

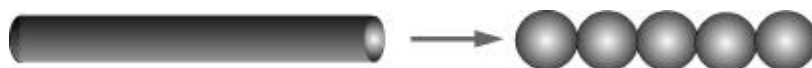


Abbildung 7-3: Schema der Perlenkettenbildung aus einer zylindrischen Vesikelform.

Das analoge Verhalten nach der Fluoreszenzanregung von Pyren zeigt, daß hierdurch ebenfalls die Induktion einer Spannung im Membranbereich möglich wird. Die beobachtete Ausbildung peristaltischer Wellen ist im Vergleich zu der in der Literatur beschriebenen Induktion mittels optischer Pinzetten wesentlich diffuser. Die Spannungsinduktion ist in diesem Fall nicht auf einen Bereich der Membran beschränkt und die propagierenden Wellen gehen oftmals von unterschiedlichen Bereichen aus. Die Gestaltänderungen sind somit unsymmetrisch oder führen häufig zum Membranbruch.

Auf der Basis der Generierung einer lateralen Spannung ist es somit möglich, die Gestalt pyrenbeladener fluider Vesikel ohne direkten Kontakt, d.h. nicht-invasiv, zu ändern. An dieser Stelle bleibt jedoch die Frage nach der molekularen Ursache dieses Phänomens unbeantwortet.

7.1.3 Reversible Veränderung der Gestalt sphärischer Vesikel

Abbildung 7-4 zeigt die reversible Gestaltänderung eines sphärischen, fluiden Vesikels mit solubilisiertem Pyren. Das dargestellte Vesikel weist eine sehr kleine Überschußfläche Δ auf und zeigt in der wäßrigen Phase keinerlei detektierbaren Undulationen. Nach UV-Anregung erfolgt eine deutliche Zunahme des Flächenüberschusses unter Ausbildung thermisch angeregter Fluktuationen. Hierbei wird die Gestalt zunehmend elliptisch deformiert. Nach Beendigung der Anregung erfolgt eine Relaxation unter Rückbildung der Sphäre (vgl. Abbildung 7-5). Diese zeigt in der Folge keinerlei Undulationen.

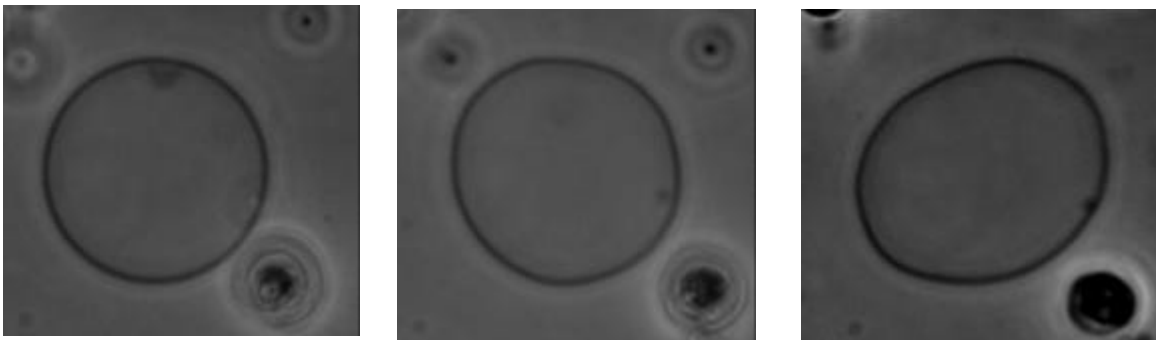


Abbildung 7-4: Sphärisches fluides DMPC-Vesikel mit geringer Überschußfläche nach Solubilisierung von Pyren (10 Mol-%) vor (linkes Bild) und nach einer UV-Bestrahlung über 30 s mit deutlich erkennbaren Undulationen (mittleres und rechtes Bild).

Dieser Vorgang ist reversibel und kann in der Folge mehrmals wiederholt werden.

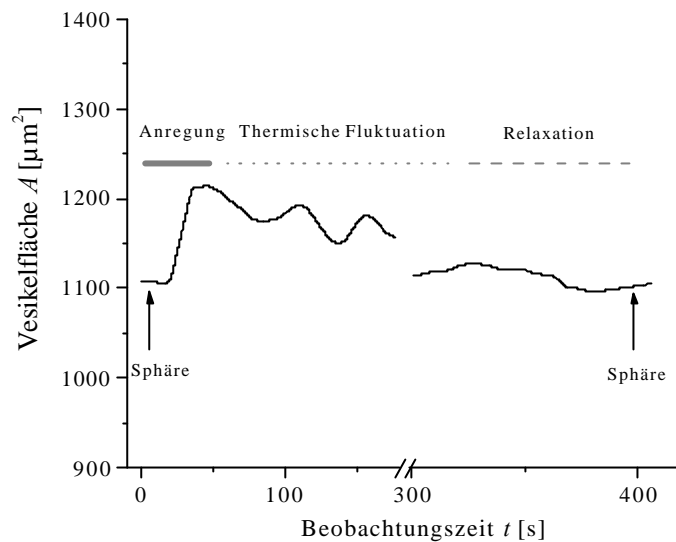


Abbildung 7-5: Zeitliche Änderung der Vesikelfläche des fluiden DMPC-Vesikels mit solubilisiertem Pyren (10 Mol-%) aus Abbildung 7-4. Gezeigt ist der erste Anregungs- sowie Relaxationszyklus der Fluktuationen als Funktion der Beobachtungszeit.

Die Analyse des Relaxationsprozesses in die sphärische Gestalt ist in Abbildung 7-6 dargestellt.

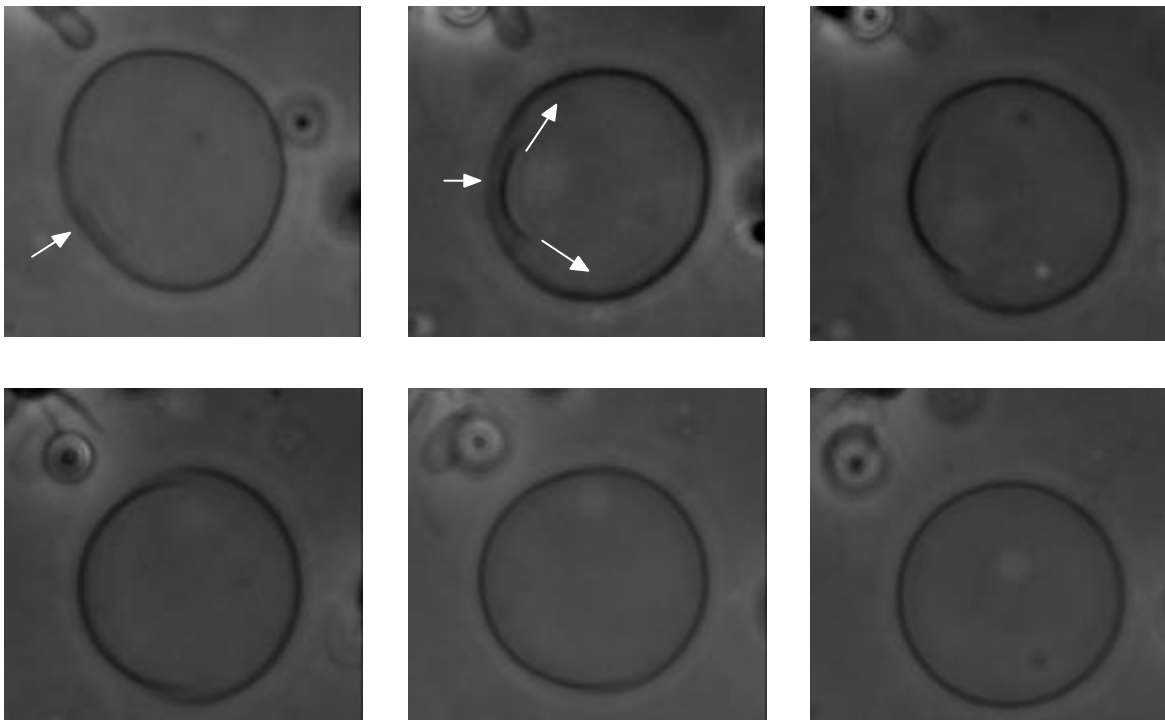


Abbildung 7-6: Relaxationsprozeß des pyrenbeladenen Vesikels (10 Mol-%) bei $T = 30^\circ\text{C}$ in Form der Gestaltänderung von einer Ellipse zur Sphäre. Die Markierung zeigt den Beginn und die Ausbreitung der relaxierten Domäne bis zur vollständigen Ausbildung der Sphäre. Die Bildfolge entspricht dem in Abbildung 7-5 gezeigten Relaxationsbereich.

Hierbei wird deutlich, daß der eigentliche Relaxationsprozeß vermutlich in Form einer Nukleation in einem diskreten Bereich des Vesikels auftritt. Dieses Phänomen wird mikroskopisch erkennbar, da sich in diesem Bereich die Membrankrümmung ändert. Die entstehende Domäne wächst in der Folge an, bis sich im gesamten Vesikelbereich das neue Gleichgewicht eingestellt hat.

Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen (Abbildung 7-7) zeigen während der Anregungsphase, in der noch keinerlei Fluktuation des Vesikels zu beobachten ist, eine signifikante Abnahme der Excimerfluoreszenz (Abbildung 7-8). Diese erreicht eine konstante Intensität zu Beginn der beobachtbaren Undulationen.

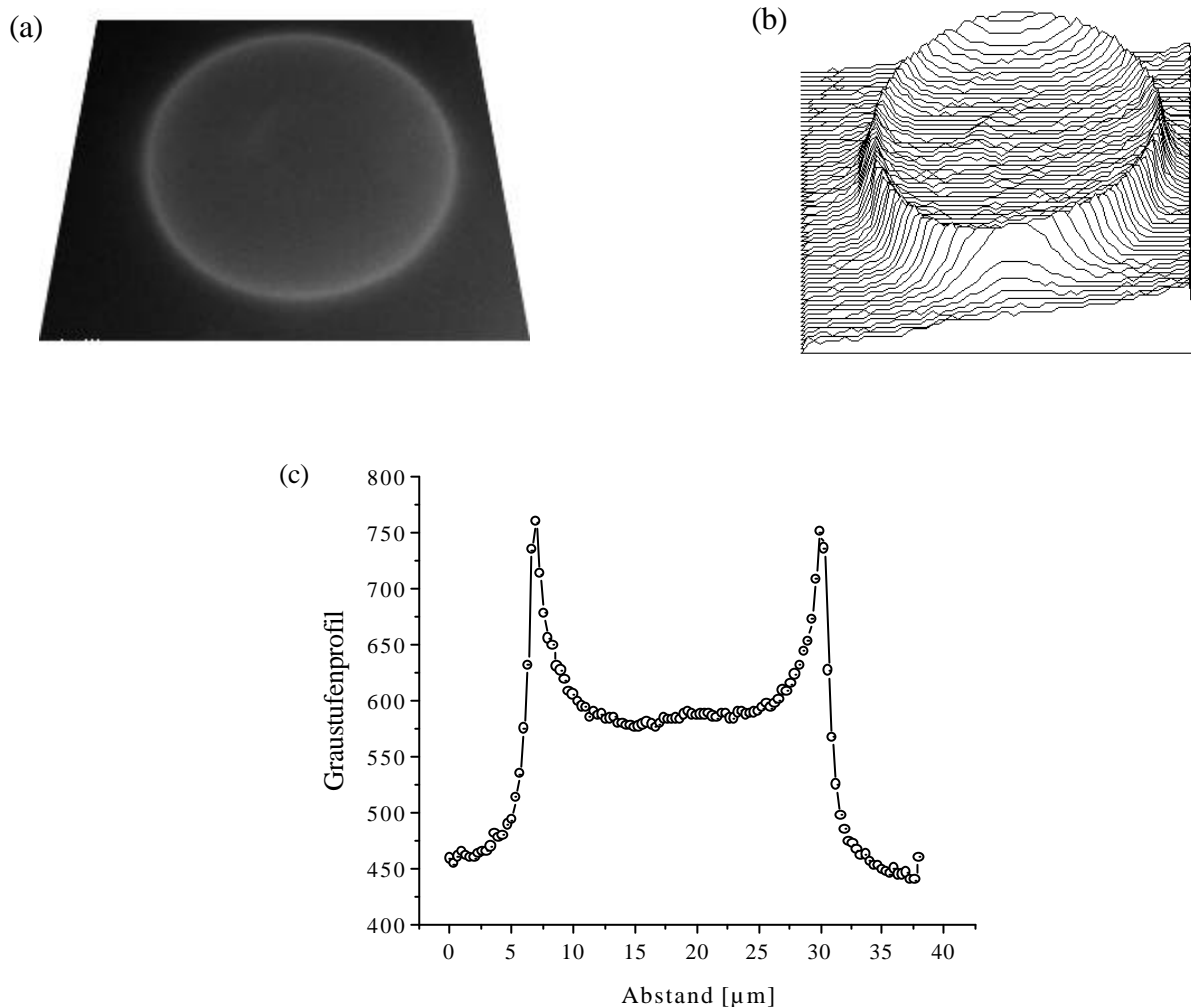


Abbildung 7-7: Fluoreszenzmikroskopisches Bild des pyrenbeladenen Vesikels nach Anregung unter Verwendung eines Breitbandanregungsfilters ($I_{\text{Anr.}} = 330 - 385 \text{ nm}$) und eines Sperrfilters ($I_{\text{Sperr.}} = 420 \text{ nm}$). (a) Membranbereich mit der charakteristischen bathochrom verschobenen blauen Fluoreszenz des Excimers, (b) Intensitätsprofil der Excimerfluoreszenz als Funktion der x,y -Koordinaten und (c) zweidimensionales Intensitätsprofil der Excimerfluoreszenz der Vesikeldiagonale.

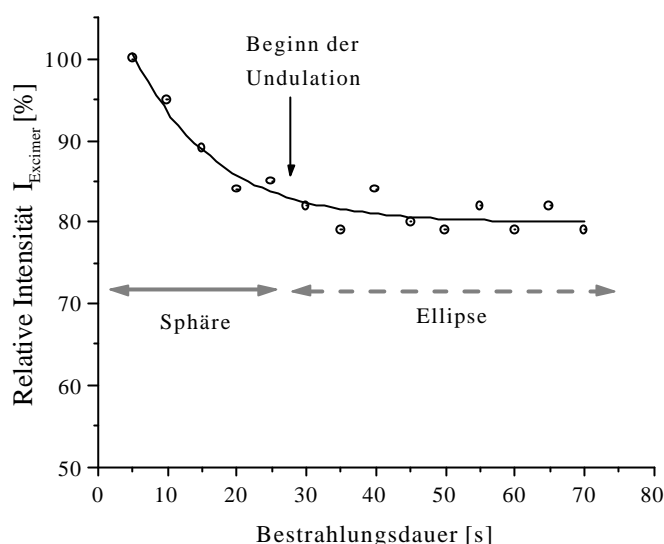


Abbildung 7-8: Verlauf der relativen Intensität der Excimerfluoreszenz als Funktion der Anregungsdauer. Der Pfeil markiert den Zeitpunkt der Gestaltumwandlung bei Beginn der Undulation.

Ein Vergleich der Biegesteifigkeiten während und nach Bestrahlung verdeutlicht ferner einen Anstieg der Werte von k_c (vgl. Tabelle 7-2) bei UV-Bestrahlung. Da für die Biegesteifigkeit gemäß Gleichung (1.6) die vereinfachte Beziehung

$$k_c \approx 4gd_1D \quad (7.1)$$

gilt, ist dieser Anstieg vermutlich im wesentlichen die Folge einer erhöhten Grenzflächen-spannung, bedingt durch den vergrößerten Platzbedarf des Amphiphils. Ferner sollte eine mögliche Temperaturerhöhung vernachlässigbar sein, da diese zu einer Erniedrigung der Biegesteifigkeit führt. Aufgrund der Reversibilität der Gestaltänderungen können chemische Reaktionen, wie Photodimerisierungen sowie die Reaktion mit Sauerstoff weitestgehend ausgeschlossen werden.

Die angeführten Ergebnisse erlauben nunmehr eine Erklärung der beobachteten Phänomene. Pyren zeigt innerhalb des lipophilen Membranbereichs aufgrund der hohen Konzentration eine ausgeprägte Tendenz zur Bildung von Excimeren durch Annäherung zweier Pyrenmoleküle auf etwa 0.3 nm. Die Einlagerung eines so ausgedehnten Moleküls ist jedoch vergleichbar ungünstig und sollte zu erheblichen Membranspannungen führen. Ferner weisen angeregte Monomere eine Lebensdauer von etwa 200 ns auf [59] und sind in der Lage, in Richtung der Kopfgruppen zu diffundieren [60]. Die entsprechenden Excimere sind hierzu nicht befähigt und verbleiben im lipophilen Bereich [62]. Entsprechend kann die Abnahme der Excimerfluoreszenz in Abbildung 7-8 mit einer Diffusion angeregter Monomere in den Kopfgruppenbereich des Amphiphils erklärt werden [60]. Die Diffusion wird durch die erhöhte Polarität des angeregten Pyren begünstigt. Als Folge des erhöhten Platzbedarfs des Solubilisats wird die Membran lateral ausgedehnt und letztendlich die Vesikelgestalt geän-

dert. Mit Beendigung der Anregung relaxiert das System relativ langsam, da eine Reorganisation von Solubilisat und Amphiphil einsetzt.

Auf dieser Grundlage werden die Beobachtungen im Bereich tubusförmiger Vesikel verständlich. Während eine Sphäre nahezu gleich viele Moleküle in den Monoschichten ausweist, resultiert bei einem Zylinder ein Amphiphilüberschuß auf der äußeren Seite. Folglich ist die Einlagerung eines Solubilisats ebenfalls unsymmetrisch und zwar umso ausgeprägter, je höher die Krümmung der vesikulären Struktur ist. Bei UV-Anregung werden die Pyrenmonomere nun bevorzugt in Richtung der äußeren Kopfgruppe verdrängt, da die Kopfgruppen der Amphiphile der inneren Monoschicht dichter gepackt sind. Hierdurch findet konsequenterweise eine Krümmung der ebenen Membran entlang der Längsrichtung des Tubus und die beschriebene Änderung der Gestalt statt.

7.1.4 Zusammenfassung

Die Einlagerung von Pyren in fluide DMPC-Doppelschichten ermöglicht die Konstruktion morphologisch schaltbarer, supramolekularer vesikulärer Aggregate auf der Mikrometerskala. Gespannte unilamellare Vesikel ändern nach Anregung mit ultravioletttem Licht ihre Gestalt und relaxieren nach Beendigung der Bestrahlung in die Ausgangslage. Grund für diese reversible Änderung der Morphologie ist die Erhöhung des Platzbedarfs von Pyren im lipophilen Bereich und die hierdurch bedingte laterale Ausdehnung der Doppelschicht bei konstantem inneren Vesikelvolumen. Bei pyrenengesättigter Wasserphase bleibt die Zusammensetzung des Gemisches erhalten und gespannte vesikuläre Systeme können auf diese Weise nicht-invasiv reversibel geschaltet werden.

7.2 Vesikel als Templat zur Polymerisation

Die spontane Selbstorganisation der Lipide in wäßriger Lösung zu supramolekularen Aggregaten eröffnet eine Vielzahl potentieller Anwendungsmöglichkeiten. In Anlehnung an das Vorbild der Natur sollte es möglich sein, die Größe und Gestalt der Mesophasen als Templat zu nutzen [165]. Durch geeignete Modifikationen kann auf diese Weise der Weg zu stabilen Kapselmaterialien sowie hochgeordneten Systemen mit neuartigen Eigenschaften geebnet werden. Eine interessante Anwendungsmöglichkeit stellt in diesem Zusammenhang die templatgestützte Polymerisation unter Verwendung von Vesikeln dar [166], auf die im folgenden näher eingegangen werden soll.

Polymerisationen oder Polykondensationen *in* und *von* Vesikeln sind vielfach verwendete Methoden zur Stabilisierung der Lipiddoppelschicht und dienen zum Beispiel der Aufrechterhaltung der Integrität der Vesikel [165]. Bei der Polymerisation *von* Vesikeln werden polymerisierbare Lipide verwendet, die im lipophilen Bereich der Acylreste oder im Kopfgruppenbereich funktionalisiert sind. Durch die Polymerisation wird die Membran weitestgehend quervernetzt und die Struktur in ihrer Mobilität eingefroren. Anwendungen

finden sich beispielsweise im Bereich der oralen Applikation wasserlöslicher liposomaler Wirkstoffe. Hier müssen die Vesikel resistent gegenüber Veränderungen in den Milieubedingungen sein, um den Wirkstoff nicht frühzeitig freizusetzen [167].

Demgegenüber steht definitionsgemäß die Polymerisation *in* Vesikeln, die eigentliche templatgestützte Polymerisation. Vesikel weisen im wesentlichen drei Bereiche auf, die für eine Polymerisation zugänglich sind (vgl. Abbildung 7-9).

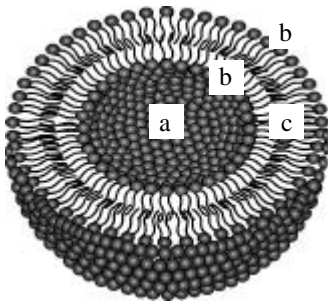


Abbildung 7-9: Schematische Darstellung der drei möglichen, zur Templatpolymersiation verwendbaren Bereiche sphärischer Vesikel (als Schnitt durch die Struktur dargestellt):

- a) inneres wässriges Kompartiment,
- b) Grenzfläche Lipid-Wasser,
- c) lipophiler Membranbereich.

Die Polymerisation eines hydrophilen Monomers im wässrigen inneren Kompartiment der Vesikel ermöglicht die Darstellung hydrophiler Polyacrylamid-Latices mit definierter Größe und sphärischer Gestalt [168].

Die sogenannten „Liposomen im Netz“ beruhen auf dem Konzept der Stabilisierung natürlicher Zellmembranen durch Ankopplung polymerer Gerüstsubstanzen im Bereich der Lipid-Wasser Grenzfläche. Unter Verwendung polymerisierbarer Gegenionen können analoge Modellsysteme dargestellt werden. Das Polymergerüst tritt nach der Synthese vorwiegend über elektrostatische Wechselwirkungen oder hydrophobe Ankergruppen mit der Membran in Wechselwirkung [169].

7.2.1 Polymerisation in Vesikeln

Der Schwerpunkt dieses Kapitel soll auf die dritte Möglichkeit der templatgestützten Polymerisation im lipophilen Membranbereich der Vesikel (Abbildung 7-9 c) gesetzt werden. Bei dieser Methode fungiert die vergleichsweise dünne Doppelschicht als Templat zur Konservierung der nahezu sphärischen Vesikelgestalt. Nach Einlagerung einer lipophilen, polymerisierbaren Substanz wird diese radikalisch polymerisiert und somit ein Netzwerk im lipophilen Membranbereich erzeugt. Auf diese Weise soll zum einen eine weitere Möglichkeit eröffnet werden, Vesikel zu stabilisieren. Zum anderen sollte es möglich sein, nach Entfernen des Amphiphils Polymerhohlkugeln unter Konservierung der sphärischen Gestalt darzustellen. Je nach eingesetzter Vesikelgröße kann das Kapselmateriale Größenbereiche von einigen Nanometern bis in den Mikrometerbereich abdecken [170]. Durch Funktionalisierung des Polymers eröffnen sich hierdurch Wege zu neuartigen sehr dünnen Kapselmaterialien.

Die ersten erfolgreichen Versuche zur radikalischen Polymersiation im lipophilen Membranbereich wurden unter Verwendung eines Gemisches aus Styrol und Divinylbenzol in Dioctadecyldimethylammoniumbromid-(DODAB)-Vesikeln im Jahre 1986 von Murtagh und Thomas durchgeführt [171]. Hierauf aufbauend erfolgten Experimente zur Erzeugung und Isolierung polymerer Hohlkugeln [172]. Elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigten jedoch, daß die Polymerisation nicht homogen erfolgt und zur Bildung sogenannter „Fallschirmstrukturen“ unter Anreicherung des Polymers führt [173]. Erst unter Verwendung eines Gemisches aus Methacrylsäurebutylester und 1,2-Bis(methacrylsäure)glycolester gelang die homogene Polymerisation in Dimethyldioctadecylammoniumchlorid-(DODAC)-Vesikeln. Auf diese Weise konnten erstmals Polymerkugeln im Bereich einiger Mikrometer isoliert und mikroskopisch untersucht werden [170]. Hierbei wird angenommen, daß es sich bei den großen Polymerstrukturen um Hohlkörper handelt, die durch Fusion kleiner Vesikel und anschließender Polymerisation entstanden sind [170].

Die beschriebene Problematik der Polymerisation im lipophilen Membranbereich war Motivation zur detaillierten Untersuchung der Dynamik des Polymerisationsvorgangs im Bereich riesiger Vesikel. Hierdurch sollte es möglich sein, einen gezielten Einblick in die zur Konservierung der Templatgestalt nötigen Parameter zu erhalten. Zu diesem Zweck wurden äquimolare Monomergemische von Styrol und *p*-Divinylbenzol sowie Methacrylsäurebutylester und 1,2-Bis(methacrylsäure)glycolester (vgl. Abbildung 7-10) zunächst in Riesenvesikeln copolymerisiert. Der eigentliche Vorgang der Polymerisation wurde hierbei videomikroskopisch untersucht. Ferner erfolgte eine protonenresonanzspektroskopische sowie kalorimetrische Charakterisierung der Polymerbildung in kleinen (SUV) bzw. großen (LUV) unilamellaren Phospholipidvesikeln.

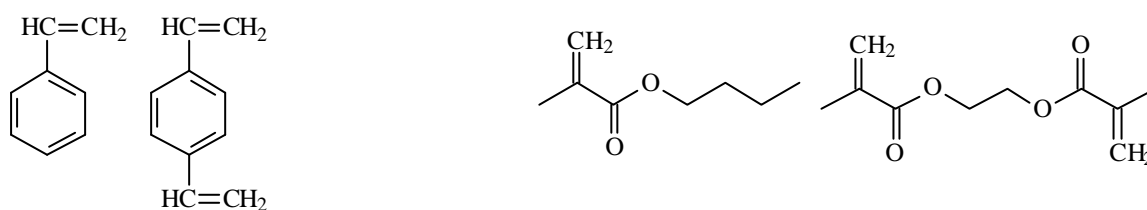


Abbildung 7-10: Strukturformeln der zur Polymerisation verwendeten lipophilen Monomergemische

- a) Styrol, *p*-Divinylbenzol
- b) Methacrylsäurebutylester, 1,2-Bis(methacrylsäure)glycolester.

7.2.2 Mikroskopische Untersuchung der Polymerisation in Riesenvesikeln

Die Verwendung einer Aufrichtfluoreszenzeinrichtung in Kombination mit Methoden der Videomikroskopie erlaubt die photochemische Initiierung der Polymerisation lipophiler Monomere im lipophilen Membranbereich von Vesikeln. Gleichzeitig können die einzelnen unilamellaren Vesikel beobachtet und auf morphologische Veränderungen während des Polymerisationsvorgangs untersucht werden.

7.2.2.1 Polymerisation unter Verwendung eines Styrol/Divinylbenzol-Gemisches

Abbildung 7-11 zeigt die morphologischen Veränderungen eines DMPC-Vesikels im Verlauf der Polymerisation eines Gemisches von Styrol und Divinylbenzol im lipophilen Bereich der Doppelschicht. Als photochemischer Starter wurden AIBN in Spuren zugesetzt.

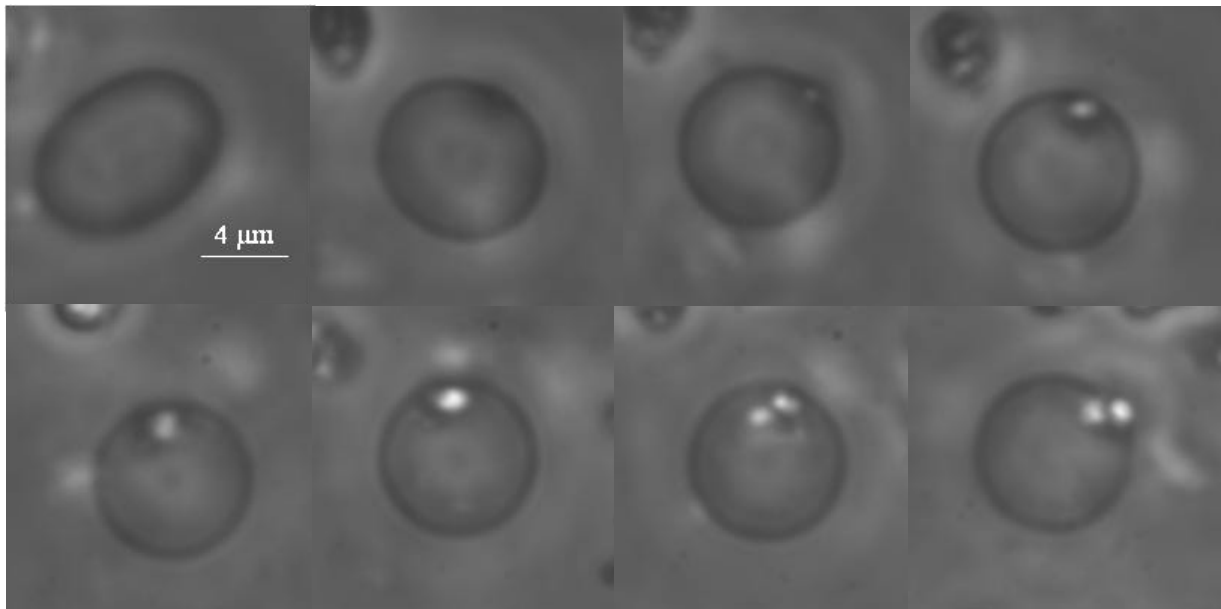


Abbildung 7-11: Verlauf der templatgestützten Polymerisation eines solubilisierten äquimolaren Gemisches von Styrol und Divinylbenzol in einem unilamellaren DMPC-Vesikel. Das Massenverhältnis von DMPC und dem Monomerengemisch beträgt 1:1. Die Bildfolge entspricht einer Zeitskala von 520 s. Die Gestaltänderung des Vesikels resultiert aus der Abnahme der Membranfläche um etwa 7 % infolge einer Netzwerkbildung. Bei den hellen Bereichen der sphärischen Struktur handelt es sich um phasensepariertes Copolymer.

Die elliptische Vesikelgestalt geht im Verlauf der Polymerisation in eine sphärische Form über. Nach Ausbildung der Sphäre wird ferner die Bildung eines Polymerlatexteilchens als heller Bereich beobachtbar. Hierbei handelt es sich um phasensepariertes Polymer im Membranbereich. Diese Phasenseparation ist im allgemeinen nach einem Bestrahlungszeitraum von etwa 50 - 80 s zu beobachten und erfolgt auch bei Verwendung geringer Monomerkonzentrationen.

Sie tritt bevorzugt im Bereich von Membrandefekten auf. Die polymerhaltigen Vesikel zeigen aufgrund der höheren Dichte des Polymers eine deutliche Tendenz zur Sedimentation.

Die Polymerisation erfolgt typischerweise unter Abnahme des reduzierten Volumens des Vesikels und ist folglich mit einer Formumwandlungen verbunden (vgl. Abbildung 7-12).

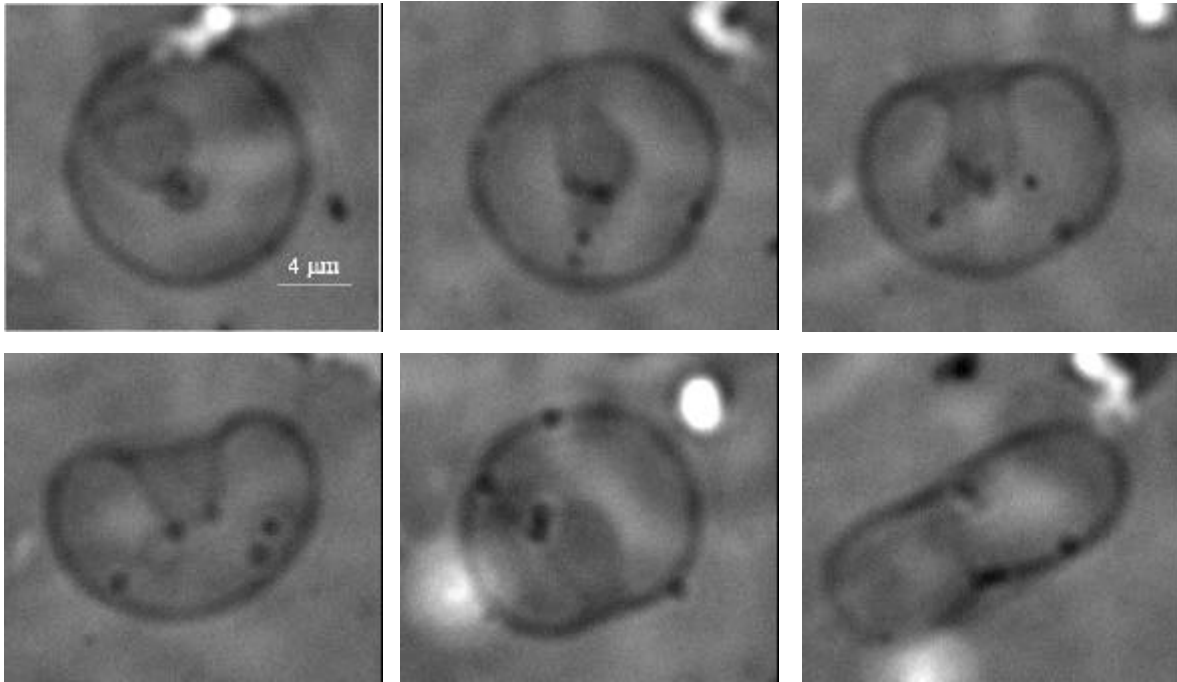


Abbildung 7-12: Durch radikalische Polymerisation eines Styrol/Divinylbenzol-Gemisches verursachte Formumwandlung eines DMPC-Vesikels von der Stomatocyte in eine Diskocyte nach UV-Bestrahlung bei $T = 31^\circ\text{C}$. Die Bilder entsprechen zeitlichen Abständen von 15 s. Die dunklen Bereiche zeigen phasensepariertes Polymer. Die diskoide Gestalt entspricht der stabilen Form nach der Polymerisation.

Grund für die Abnahme des reduzierten Volumens und respektive der Überschußfläche ist die Volumenkontraktion im lipophilen Bereich der Doppelschicht durch die Polymerbildung. Das Polymer weist im Vergleich zum Monomer eine um etwa 15 % höhere Dichte auf und bewirkt somit effektiv eine Abnahme der Vesikelfläche bei konstantem inneren Volumen. Die jeweilige Änderung der Gestalt ist aufgrund der Netzbildung irreversibel.

Ausgehend von einer sphärischen Vesikelgestalt, die die kleinste Membranfläche bei konstantem eingeschlossenen Volumen aufweist, sollte folglich eine weitere Reduktion der Membranfläche während der Polymerisation nicht möglich sein. Abbildung 7-13 zeigt den entsprechenden Polymerisationsvorgang am Beispiel eines sphärischen Vesikels mit vernachlässigbarer Überschußfläche.

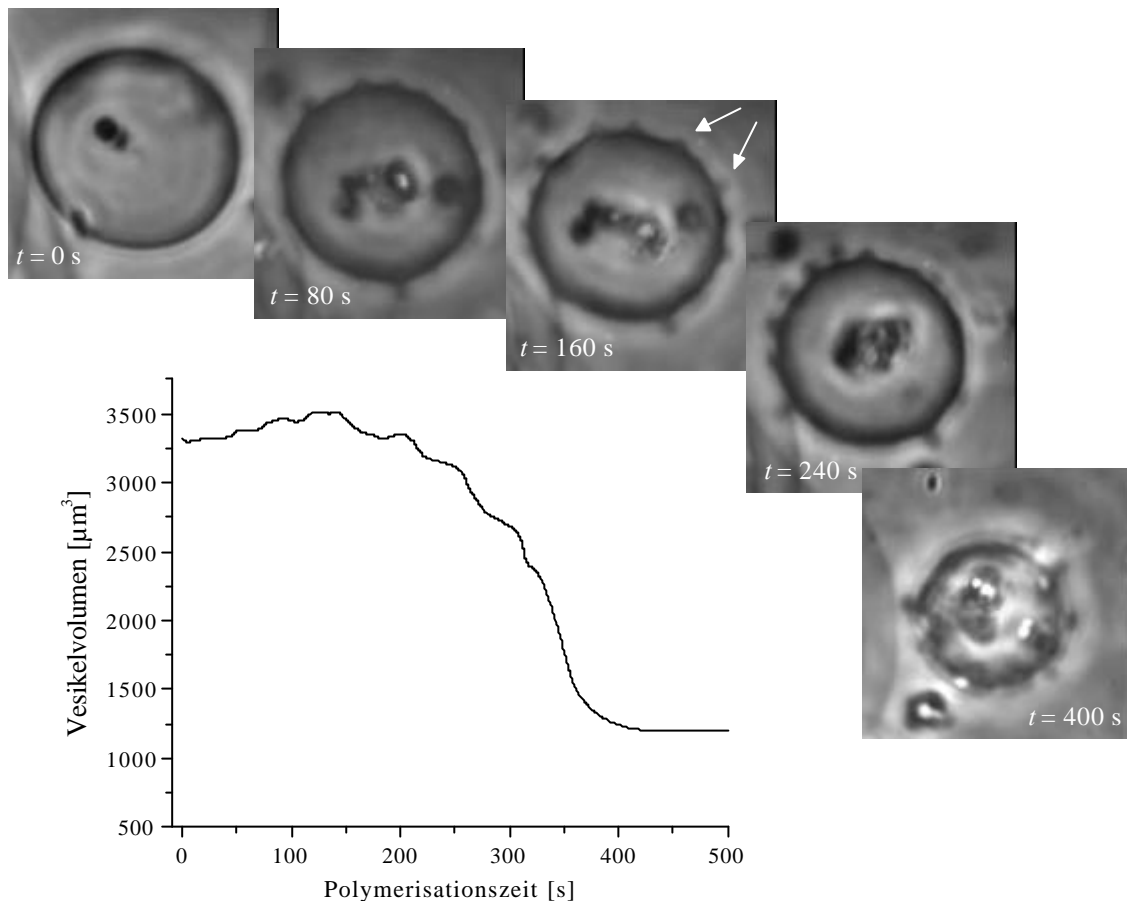


Abbildung 7-13: Zeitlicher Verlauf der photochemisch initiierten Polymerisation eines solubilisierten Styrol/Divinylbenzol-Gemisches in einem sphärischen DMPC-Vesikel. Dargestellt sind die zeitliche Entwicklung des Vesikelvolumens und die entsprechenden mikroskopischen Aufnahmen. Das Vesikel weist vor der Polymerisation zum Zeitpunkt $t = 0$ eine geringe Überschußfläche auf. Die Entstehung des Polymers führt zur Bildung von Knospen (Markierung durch Pfeile), in denen das Polymer angereichert wird. Die Volumenabnahme ist letztendlich eine Folge des Bruchs der Membran.

Die Kontraktion der Vesikelfläche führt aufgrund des fehlenden Flächenüberschusses zu einer starken lateralen Kompression der Doppelschicht. Hierdurch steigt der Druck im wässrigen Inneren des Vesikels. Im weiteren Verlauf der Polymerisation kommt es zu einem Bruch der Membran unter Reduktion des inneren wässrigen Volumens. Auffällig ist, daß die Ausstülpung der Membran in Form gleichmäßig verteilter, nach außen gerichteter Knospen homogener Größe erfolgt, in denen eine Anreicherung des entstehenden Polymers zu beobachten ist. Hierbei handelt es sich vermutlich um ein domäneninduziertes Knospen (vgl. Kapitel 5) aufgrund auftretender Linienspannungen im Bereich der Polymerdomänen. Die zur Knospenbildung aufzuwendende Krümmungsenergie folgt aus der nach außen gerichteten Kraft aufgrund des hohen inneren Drucks.

Die Reduktion der Membranfläche während der Polymerisation sollte ferner zu einer lateralen Kompression der Phospholipidmoleküle führen. Dies wird durch die Ergebnisse der ^1H -NMR-spektroskopischen Untersuchungen bestätigt (Tabelle 7-3).

Tabelle 7-3: ^1H -NMR-Untersuchung der thermisch induzierten Styrol/Divinylbenzol-Copolymerisation in kleinen unilamellaren DMPC-Vesikeln in D_2O . Vergleichend sind jeweils die chemischen Verschiebungen δ der Resonanzen der Methylgruppen des Kopfgruppenbereichs sowie der Methylen- und der terminalen Methylgruppen der Acylreste von DMPC aufgeführt.

Substanz	δ [ppm]		
	$\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$	$(\text{CH}_2)_n$	CH_3
DMPC-Vesikel (SUV)	3.27	1.28	0.90
Vesikel mit Monomeregemisch	3.25	1.13	0.80
Vesikel nach Copolymerisation	3.31	1.32	0.98

Die Solubilisierung der Monomeren im lipophilen Membranbereich verursacht aufgrund der Anisotropie des aromatischen Systems eine Hochfeldverschiebung der Methylen- und Methylresonanzen von DMPC. Ein spektroskopischer Vergleich der Proben vor und nach der Polymerisation zeigt die vollständige Reaktion der Monomeren, wobei keinerlei Polymerresonanz beobachtbar ist (Daten nicht aufgeführt). Die Signale der Methylen- und Methylresonanzen der Acylreste sind bei Anwesenheit des Polymers stark verbreitert und nur mäßig unterscheidbar. Das Signal der Methylgruppe des Cholins bleibt hingegen neben einer geringfügigen Erhöhung der Halbwertsbreite nahezu unbeeinflusst. Die deutliche Tieffeldverschiebung, insbesondere der Resonanz der Methylprotonen des lipophilen Amphiphilbereichs nach der Polymerisation, ist ein deutliches Indiz für eine laterale Kompression und das Verdrängen des Solubilisats aus dem Zwischenlipidbereich in die Mitte der Doppelschicht unter Separation der beiden Monoschichten. Die resultierenden Signale ähneln in Halbwertsbreite und chemischer Verschiebung zunehmend denen des Phospholipids im Gelzustand.

Die ausgeprägte Tendenz zur Bildung mikroskopisch visualisierbarer Polymerpartikel im Membranbereich wird durch die Inkompatibilität des Styrol/Divinylbenzol-Copolymers mit der Lipidmatrix bedingt. Wie bereits gezeigt werden konnte, sind Moleküle wie Styrol aber auch Divinylbenzol molekular gut im lipophilen Membranbereich von Phosphatidylcholin-vesikeln löslich. Das entstehende Copolymer zeigt eine schlechte Löslichkeit in Kohlenwasserstoffen [173] und ist somit weitestgehend inkompatibel mit dem lipophilen Bereich der Doppelschicht. Diese Inkompatibilität führt letztendlich zur Segregation des Polymers innerhalb der Doppelschicht unter Ausbildung eines Polymerpartikels. Ferner resultiert eine erhöhte Tendenz des Polymers sich in seinem Monomer zu lösen. Da die Beweglichkeit der Polymers in der Lipidmatrix stark eingeschränkt sein sollte, ist eine verstärkte Diffusion

des Monomers in Richtung des Polymers zu erwarten. Die durch die Polymerdomänen bedingte Störung der Lipidmatrix führt zu einer Anreicherung des Monomers und lokal zu einem verstärkten Polymerwachstum. Hierdurch entstehen Latexpartikel, die im Membranbereich verankert bleiben.

Die irreversible Gestaltänderung der Vesikel während der Polymerisation deutet dennoch auf eine Netzbildung im lipophilen Membranbereich hin. Auch konnten in den meisten Fällen nach der Polymerisation netzwerkartige Strukturen isoliert werden, die jedoch kollabierten.

7.2.2.2 Polymerisation unter Verwendung von Methacrylaten

Die Polymerisation im lipophilen Bereich der Doppelschicht unter Verwendung eines äquimolaren Gemisches von Methacrylsäurebutylester und 1,2-Bis(methacrylsäure)glycol-ester liefert keinerlei vergleichbare Hinweise auf eine Phasenseparation des Copolymers. In Analogie zum beschriebenen Styrol/Divinylbenzol-Copolymerisat führt die Netzbildung ebenfalls zu einer deutlichen Reduktion der Überschussfläche. Abbildung 7-14 zeigt die Abnahme der thermisch bedingten Undulation eines quasi-sphärischen DMPC-Vesikels aufgrund einsetzender Netzbildung. Die Polymerisation verläuft ohne signifikante Änderung des inneren Vesikelvolumens. Nach vollständiger Polymerisation liegt eine sphärische Vesikelgestalt vor, die keinerlei thermisch bedingte Fluktuation zeigt.

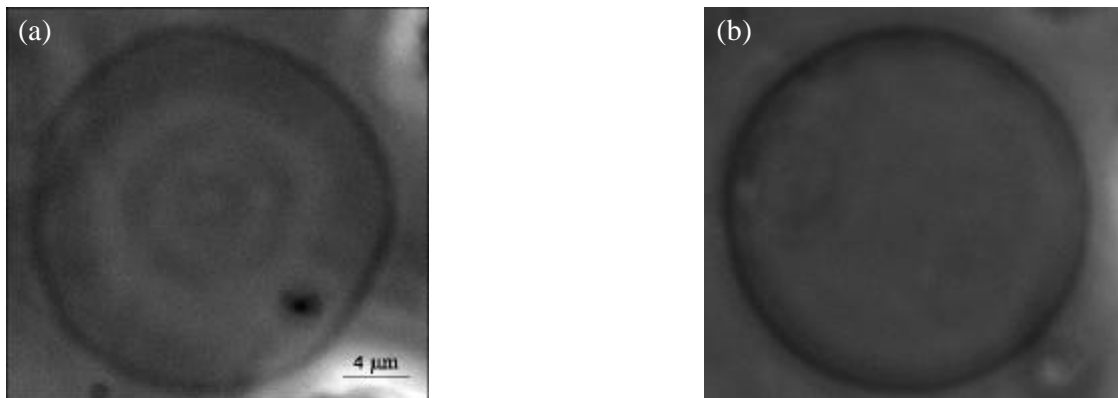


Abbildung 7-14: Polymerisation eines äquimolaren Gemisches von Methacrylsäurebutylester und 1,2-Bis(methacrylsäure)glycol-ester in einem DMPC-Vesikel bei $T = 33^\circ\text{C}$. (a) Vesikel vor der Polymerisation nach Einquellen der Monomere (50 Gew.-%) in die lipophile Doppelschicht. Das Vesikel zeigt thermisch angeregte Fluktuationen mit $k_c = (0.9 \pm 0.1) \cdot 10^{-19} \text{ J}$, $\bar{S} = 1$, $\Delta = (66 \pm 10) \cdot 10^{-3}$, ($V = 4990 \mu\text{m}^3$). Nach dreiminütiger UV-Bestrahlung (b) sinkt aufgrund der Netzbildung die Überschussfläche $\Delta = (8 \pm 3) \cdot 10^{-3}$ unter Anstieg der elastischen Parameter $k_c = (11 \pm 2) \times 10^{-19} \text{ J}$, $\bar{S} = 20$, ($V = 5000 \mu\text{m}^3$), bis schließlich keinerlei Undulationen beobachtbar sind.

Die Biegesteifigkeit des Vesikel ist nach Solubilisierung der Monomere im Vergleich zum unbeladenen Vesikel mit $k_c = (0.9 \pm 0.1) \cdot 10^{-19} \text{ J}$ deutlich erniedrigt, steigt jedoch mit Beginn der Polymerisation sprunghaft auf $k_c = (11 \pm 2) \cdot 10^{-19} \text{ J}$ an. Im Unterschied zum Styrol/Divinylbenzol-Copolymer ist das Polymer aus Methacrylsäurebutylester und 1,2-Bis(methacrylsäure)glycolester relativ schlecht in seinen Monomeren, hingegen gut in Kohlenwasserstoffen löslich und scheinbar kompatibel mit der Membran. Während der Polymerisation konnte in keinem der Fälle eine Phasenseparation des Polymers unter Domänenbildung beobachtet werden.

Differenzkalorimetrische Untersuchungen der Polymerisation in großen unilamellaren Vesikeln (LUV) bestätigen die erfolgreiche Vernetzung (Abbildung 7-15).

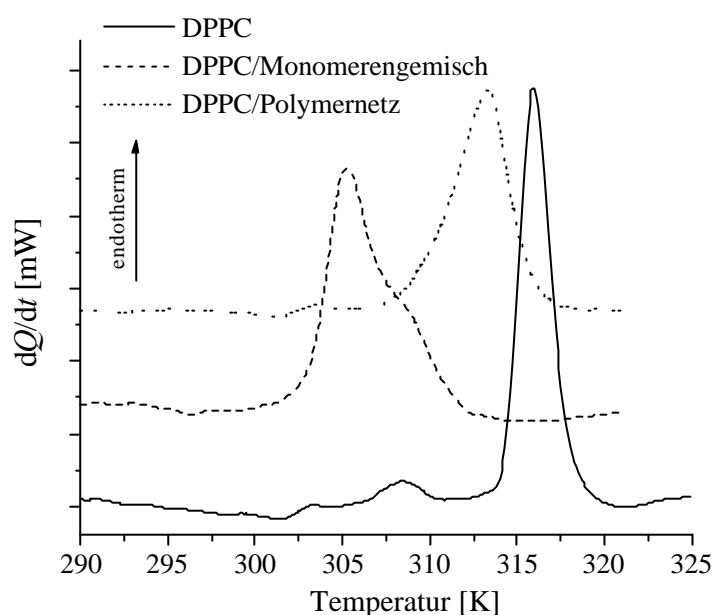


Abbildung 7-15: Kalorimetrische Untersuchung der Polymerisation eines äquimolaren Gemisches von Methacrylsäurebutylester und 1,2-Bis(methacrylsäure)glycolester in großen unilamellaren DPPC-Vesikeln (LUV). Die Thermogramme zeigen die Phasenumwandlungen des reinen DPPC, sowie von DPPC nach Solubilisierung des Monomerengemisches (50 Mol-%) und nach thermischer Polymerisation.

Die Solubilisierung des Monomerengemisch führt zunächst zu einer deutlichen Erniedrigung der Umwandlungstemperatur der Hauptumwandlung unter Abnahme der Kooperativität der Umwandlung. Die Asymmetrie des Umwandlungspeaks deutet ferner auf eine bevorzugte Einlagerung des Solubilisats in der Gelphase von DPPC (vgl. Diskussion in Kapitel 3.1.4). Dies zeigt, wie auch der geringe Einfluß auf die Umwandlungsenthalpie (Tabelle 7-4), eine erhöhte Affinität des Methacrylatgemisches zum Kopfgruppenbereich des Amphiphils. Nach der Polymerisation ist diese Affinität nicht mehr zu beobachten. Umwandlungstemperatur und Symmetrie der Hauptumwandlung entsprechen nahezu dem reinen

DPPC. Einzig die erhöhte Halbwertsbreite deutet auf eine Beeinflussung der Lipidmoleküle hin. Das Polymer sollte somit vorwiegend im lipophilen Bereich zwischen den Monoschichten lokalisiert sein. Ferner findet eine bevorzugte Wechselwirkung des Polymers mit der fluiden Amphiphilmatrix statt.

Tabelle 7-4: Ergebnisse der kalorimetrischen Untersuchung der Copolymerisation von Methacrylsäurebutylester und 1,2-Bis(methacrylsäure)glycolester in DPPC-Vesikeln.

Substanz	T_m [°C]	$\Delta T_{1/2}$ [K]	ΔH_m [kJ·mol ⁻¹]	ΔS_m [J (mol · K) ⁻¹]
DPPC-Vesikel (LUV)	42.7	1.6	31.9	101
Vesikel mit Monomergemisch	31.9	3.9	31.3	103
Vesikel nach Copolymerisation	40.3	3.2	25.2	80

7.2.3 Isolierung des Polymernetzwerks

Der Nachweis der Existenz eines Polymernetzwerkes erfolgte mit Hilfe der Videomikroskopie. In einigen Fällen deuten die Beobachtungen auf die Existenz netzwerkartiger Strukturen im Membranbereich der Vesikel nach Polymerisation der lipophilen Monomere (vgl. Abbildung 7-16).

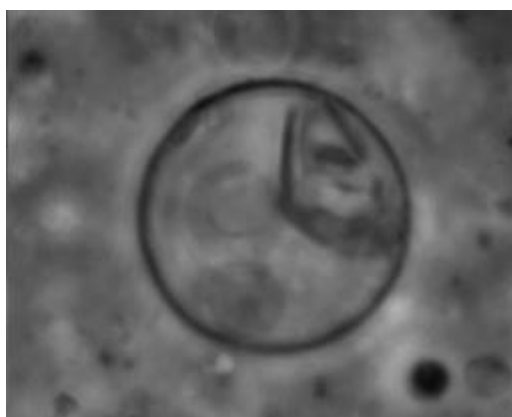


Abbildung 7-16: Polymerfragmente im Bereich der Doppelschicht eines DMPC-Vesikels ($d = 22.9 \mu\text{m}$) nach Polymerisation eines äquimolaren Gemisches von Methacrylsäurebutylester und 1,2-Bis(methacrylsäure)glycolester.

Eine Visualisierung der Freisetzung des Polymers nach Entfernen des Amphiphils gelang jedoch nur unter Verwendung multilamellarer Vesikel. Diese wurden nach der Polymerisation des Monomergemisches im lipophilen Bereich der Doppelschicht in Ethanol gelöst (Abbildung 7-17).

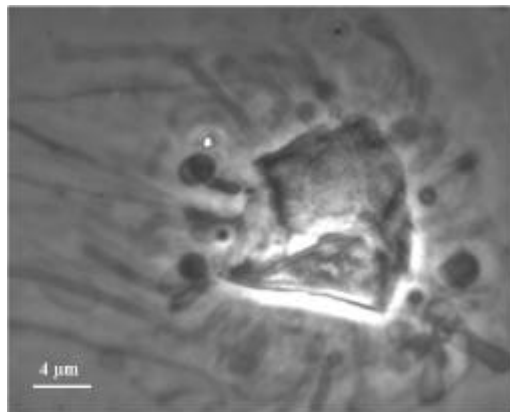


Abbildung 7-17: Langsames Ablösen der Doppelschichten eines multilamellaren Vesikels in Form tubusförmiger Doppelschichtstrukturen unter Freisetzung des Methacrylatpolymers in der Bildmitte. Der Gradient der Ethanolkonzentration fällt von rechts nach links.

Jegliche Versuche der Konservierung des Polymers in der sphärischen Gestalt scheiterten im Bereich riesiger Vesikel. Abbildung 7-18 zeigt die videomikroskopischen Aufnahmen des isolierten Polymers nach vollständiger Entfernung des Amphiphils.

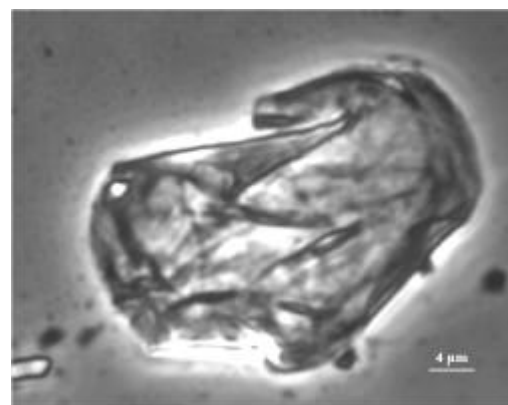
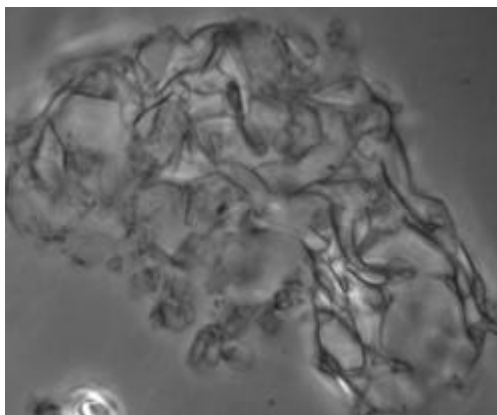


Abbildung 7-18: Phasenkontrastmikroskopische Aufnahmen der Polymerstrukturen nach Polymerisation in multilamellaren Vesikeln und anschließendem Entfernen des Amphiphils. Linkes Bild: großes Agglomerat mehrerer Fragmente von Polymethacrylat; rechtes Bild: isoliertes Polystyrol/Divinylbenzol.

Die videomikroskopischen Aufnahmen bestätigen die Bildung eines zweidimensionalen Netzwerks, welches einen Hohlraum aufspannt. Sphärische Strukturen können in dieser Größenordnung jedoch nicht beobachtet werden. Unter der Annahme der Bildung einer homogenen Polymerschicht sollte eine Schichtdicke von 1 - 3 nm zu erwarten sein. Diese ist sehr klein im Vergleich zum gesamten Durchmesser von etwa 30 μm , so daß die sphärische Hohlraumstruktur vermutlich kollabiert.

Erschwerend kommt hinzu, daß Vesikel in diesen Größenbereichen vielfach kleinere Defekte in der Membran sowie Bereiche unterschiedlicher Krümmung aufweisen können. Diese führen zu Inhomogenitäten in der Zusammensetzung und wirken letztendlich einer einheitlichen Netzwerkbildung entgegen.

Eine wichtige Voraussetzung zur Nutzung der Vesikelgestalt als Templat für die Polymerisation ist somit die homogene Verteilung des Monomers und die Kompatibilität des Polymers mit der Lipidmatrix. Da im Bereich hoher Solubilisatkonzentrationen eine inhomogene Verteilung des Monomers innerhalb der Doppelschicht zu erwarten ist, kann das Molverhältnis von Monomer und Phospholipid nicht beliebig gewählt werden. Ist das Polymer im lipophilen Bereich der Doppelschicht schlecht löslich, so wird die Bildung von Latexpartikeln begünstigt. Voraussetzung für die Konservierung der Vesikelstruktur ist ferner ein vorhandener Flächenüberschuß der Vesikel vor der Polymerisation.

Eine einheitliche Polymerbildung scheint einzig unter Verwendung von Vesikeln nach Darstellung mittels Extruder (mit Durchmessern von etwa 100 nm) möglich. Vesikel in diesem Größenbereich sind jedoch mikroskopisch nicht zugänglich.

7.2.4 Zusammenfassung

Die templatgestützte, radikalische Polymerisation lipophiler Monomere ermöglicht die Erzeugung eines zweidimensionalen Netzwerkes innerhalb der Doppelschicht von Phosphatidylcholinvesikeln. Unter Verwendung von Vesikeln in Größenbereichen von etwa 30 µm ist mit Hilfe der Videomikroskopie der Einfluß der Polymerbildung auf die Vesikelgestalt nachweisbar. Ferner kann das gebildete Netzwerk isoliert werden. Die Ergebnisse können durch kalorimetrische sowie protonenresonanzspektroskopische Untersuchungen bekräftigt werden. Im Verlauf der Polymerisation kommt es zu einer Gestaltumwandlung aufgrund der Reduktion der Membranfläche bei konstantem inneren Volumen des Vesikels. Ausgehend von Vesikeln mit einem Flächenüberschuß ist somit eine Polymerisation unter Erzeugung einer sphärischen Vesikelgestalt möglich. Hierbei bleibt die Integrität der Doppelschicht erhalten, die elastischen Eigenschaften der Membran werden jedoch signifikant beeinflusst.

Ein wichtiger Aspekt zur Nutzung der Vesikelgestalt als Templat für eine homogene Netzwerkbildung ist die gleichmäßige Verteilung des Monomers sowie die Kompatibilität des Polymers mit der umgebenden Lipidmatrix. Letzteres ist unter Verwendung eines Polystyrol/Divinylbenzol-Gemisches nicht gewährleistet, da die Löslichkeit des Polymers im lipophilen Bereich der Doppelschicht unzureichend ist. Hierdurch kommt es im Verlauf der Polymerisation zu Phasenseparationen.

8 Zusammenfassung und Ausblick

8.1 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Solubilisierung lipophiler aromatischer Substanzen durch Phosphatidylcholinvesikel. Mit spektroskopischen, kalorimetrischen und videomikroskopischen Methoden erfolgte eine umfassende Charakterisierung des bislang wenig berücksichtigten Einflusses unpolarer Solubilisate auf die Eigenschaften unilamellarer Vesikel. Die Verwendung der Video-Kontrastverstärkungs-Mikroskopie ermöglichte neuartige Einblicke in die Dynamik des Einbaus von Toluol in die Doppelschicht einzelner Vesikel. Ferner wurde die Interaktion schadstoffbeladener Vesikel *in-vitro* an CHO-Zellen untersucht. Bei der Erforschung möglicher Anwendungen vesikulärer Systeme gelang mittels templatgestützter Polymerisation die Erzeugung eines Polymernetzwerkes im lipophilen Membranbereich von Vesikeln sowie die Konstruktion morphologisch schaltbarer vesikulärer Systeme auf der Basis eines lipophilen Solubilisats.

Die vorliegenden Untersuchungen zeigen, daß das Solubilisierungsvermögen unilamellarer Phospholipidvesikel für lipophile Substanzen deutlich von der Membrankrümmung der Vesikel und dem Aggregatzustand des Lipids abhängt. Große Vesikel im fluiden Zustand weisen ein hohes Solubilisierungsvermögen im Vergleich zu kleinen, gespannten Strukturen oder Vesikeln im Gelzustand auf. Die Solubilisierungskapazität ist zudem von der Form und Größe des lipophilen Solubilisats abhängig. Kleine kompakte Moleküle werden in vergleichbar großer Menge eingelagert.

Hinsichtlich der Lokalisierung konnte gezeigt werden, daß unpolare aromatische Substanzen bevorzugt im lipophilen Bereich der Doppelschicht von Phosphatidylcholinvesikeln solubilisiert werden. Mit steigender Solubilisatkonzentration erhöht sich die Tendenz zur Anreicherung im Kopfgruppenbereich, wodurch die Membranspannung der Vesikel steigt. Die strukturelle Integrität der Doppelschicht wird hierdurch deutlich beeinträchtigt und die Polarität nimmt im inneren Membranbereich zu, da Wasser vermehrt in die lipophile Doppelschicht eindringt. Zudem werden Fusionen von Vesikeln zu größeren Aggregaten begünstigt. Der Einfluß lipophiler Solubilisate auf die intrinsischen Eigenschaften der Doppelschicht manifestiert sich überdies in dem Anstieg der Fluidität des inneren Membranbereichs der Vesikel.

Anhand der durchgeführten Studien zur Dynamik des Solubilisierungsprozesses wurde eine laterale Ausdehnung der Lipiddoppelschicht nachgewiesen, die auf der palisadenförmigen Einlagerung des Solubilisats im Zwischenlipidbereich beruht. Röntgenstreuexperimente sowie theoretische Abschätzungen bestätigen die laterale Expansion der Doppelschicht, die mit einer gleichzeitigen Dickenzunahme verbunden ist. Aufgrund der Konstanz des eingeschlossenen inneren Vesikelvolumens verändert sich im Verlauf der Solubilisierung die ursprüngliche Vesikelgestalt.

Der Einbau lipophiler Substanzen in die Doppelschicht erfolgt selektiv in Bereichen niedriger Packungsdichte, ein bislang wenig beachteter Effekt. Diese Selektivität konnte unter Verwendung kleiner unilamellarer Vesikel nachgewiesen werden, die eine hohe Membrankrümmung aufweisen und lipophile Solubilisate bevorzugt im weniger dicht gepackten lipophilen Bereich der inneren Monoschicht einlagern.

Durch kalorimetrische Untersuchungen des thermotropen Phasenverhaltens konnte am Beispiel des Systems DPPC/Toluol gezeigt werden, daß die Einlagerung von Toluol nicht über den gesamten Konzentrationsbereich homogen erfolgt. Vielmehr koexistieren Regionen unterschiedlicher Solubilisatkonzentration innerhalb einzelner Vesikel. Da die lokale Konzentration mit der Membrankrümmung gekoppelt ist, hat die inhomogene Zusammensetzung einen Einfluß auf die Gestalt unilamellarer Vesikel und kann zur Bildung ungewöhnlicher Vesikelformen führen. Zudem verursachen Anreicherungen des Solubilisats vermutlich aufgrund auftretender Linienspannungen Knospungen der Membran. Im Bereich hoher Solubilisatkonzentrationen kommt es zu Phasenseparationen unter Ausbildung stabiler solubilisatreicher Domänen. Die Domänenbildung konnte mit der Video-Kontrastverstärkungs-Mikroskopie visualisiert und in ihrer Dynamik studiert werden. Infolge einer Segregation entstehen linsen-, bzw. tropfenförmige Anreicherungen der lipophilen Substanz im Kernbereich der Doppelschicht.

Die Biegesteifigkeit k_c von Vesikeln ist eine wichtige mechanische Eigenschaft, die das Verhalten in porösen Materialien und bei Annäherung an Grenzflächen maßgeblich beeinflussen kann. Da der Einfluß lipophiler Solubilisate auf die Biegesteifigkeit k_c von Vesikeln bislang unbekannt war, wurde im Rahmen dieser Arbeit eine videomikroskopische Methode zur Fluktuationsanalyse einzelner fluider, quasi-sphärischer Vesikel etabliert. Diese Methode erlaubt als einzige eine nicht-invasive Analyse und ermöglicht zudem die Bestimmung der Biegesteifigkeit im Verlauf von Solubilisierungsprozessen. Hierzu wurde die Methode leicht modifiziert und vorab mittels numerischer Simulation eingehend geprüft.

Fluktuationsanalysen riesiger unilamellarer DMPC-Vesikel zeigen eine Reduktion der Biegesteifigkeit nach Solubilisierung grenzflächenaktiver Substanzen wie Natriumdodecylsulfat, Myristinsäure oder Ethanol. Ferner konnte erstmals der konzentrationsabhängige Einfluß von Toluol als lipophilem Solubilisat auf die Biegesteifigkeit von DMPC-Vesikeln bestimmt werden. Die Biegesteifigkeit k_c sinkt trotz zunehmender Membrandicke von $(1.42 \pm 0.21) \cdot 10^{-19}$ J auf Werte von $(0.36 \pm 0.10) \cdot 10^{-19}$ J. Dieser Effekt kann auf der Basis der dargelegten Erkenntnisse erklärt werden und beruht vermutlich auf der hohen Mobilität von Toluol in der lipophilen Doppelschicht. Hierdurch erfolgt während der Auslenkung der Membran eine selektive Anreicherung des Solubilisats in Bereichen niedriger Packungsdichte unter Reduktion der Biegesteifigkeit.

Die Analyse des thermischen Flächenausdehnungskoeffizienten β zeigte weiterhin, daß die temperaturbedingte Ausdehnung der Doppelschicht von Vesikeln nach Solubilisierung

von Toluol (85 Mol-%) deutlich herabgesetzt wird. Der Koeffizient **b** von DMPC-Vesikeln sinkt entsprechend von $(6.9 \pm 0.8) \cdot 10^{-3} \text{ K}^{-1}$ auf $(1.6 \pm 0.3) \cdot 10^{-3} \text{ K}^{-1}$.

Anhand mikroskopischer Untersuchungen zur Kinetik der Solubilisierung wasserunlöslicher lipophiler Substanzen konnten erstmals grenzflächenbezogene Solubilisierungsraten $[-A^{-1} (dV/dt)]$ von unilamellaren Vesikeln ermittelt werden. Die Raten steigen oberhalb der Phasenumwandlungstemperatur T_m der Vesikel an und werden vermutlich entsprechend mikzellaren Systemen durch Prozesse an der Öl/Wasser-Grenzfläche dominiert. Hierauf weisen auch Beobachtungen an der Phasengrenze hin. Ein Einfluß der Biegesteifigkeit auf die auftretenden Grenzflächenphänomene ist nicht auszuschließen.

Vesikel/Zell-Interaktionen wurden mit Hilfe des Schwesterchromatidenaustausch-Tests untersucht. Die Ergebnisse bestätigen eine Interaktion schadstoffbeladener Vesikel mit Zellen *in-vitro*. Insbesondere kleine gespannte Vesikel können den Eintrag lipophiler Substanzen ins Zellinnere verstärken, da sie vermutlich über den Mechanismus einer Phagocytose ins Cytosol gelangen. Aus diesem Grund wird durch Solubilisierung eines lipophilen Schadstoffs in kleine unilamellare Vesikel dessen mutagenes Potential auf CHO-Zellen deutlich erhöht.

Abschließend wurde exemplarisch anhand zweier Anwendungsbeispiele die Bedeutung der Interaktion lipophiler Solubilisate mit der Phospholipiddoppelschicht aufgezeigt. Basierend auf den im Rahmen dieser Arbeit erworbenen Erkenntnissen wurde ein morphologisch schaltbares vesikuläres System entwickelt. Nach Solubilisierung von Pyren ist es möglich, die Gestalt gespannter unilamellarer DMPC-Vesikel durch UV-Bestrahlung zu ändern. Diese nicht-invasive Beeinflussung beruht auf der Erhöhung des Platzbedarfs des Solubilisats nach der Anregung und hat eine Expansion der Membranfläche bei konstantem inneren Volumen und letztendlich eine Gestaltänderung des Vesikels zur Folge. Das System relaxiert nach Beendigung der Bestrahlung und ist auf diese Weise reversibel beeinflussbar.

Mit Hilfe der templatgestützten, radikalischen Polymerisation lipophiler Monomere konnte außerdem ein zweidimensionales Netzwerk innerhalb der Doppelschicht von Phosphatidylcholinvesikeln erzeugt und die dazu nötigen Voraussetzungen studiert werden. Eine einheitliche Netzbildung erfolgt nur bei homogener Verteilung des Monomers und sofern das Polymer mit der umgebenden Lipidmatrix kompatibel ist. Dies wird unter Verwendung eines äquimolaren Gemisches von Methacrylsäurebutylester und 1,2-Bis(methacrylsäure)glycolester gewährleistet. Die Polymerbildung führt zu einer Kontraktion der Membranfläche, so daß zur Vermeidung eines Bruchs der Membran Vesikel mit einem Flächenüberschuß eingesetzt werden müssen. Die Integrität der Doppelschicht bleibt während der Polymerisation erhalten, wohingegen die elastischen Eigenschaften der Membran durch das Netzwerk signifikant beeinflusst werden.

8.2 Ausblick

Die vorgestellten Ergebnisse unterstreichen die vielfältige Bedeutung von Vesikeln sowohl im Hinblick auf die lösungsvermittelnden Eigenschaften, als auch auf mögliche Anwendungen in Form maßgeschneiderter oder funktionalisierter kolloidaler Aggregate. Diese können dem Transport und der kontrollierten Freisetzung von Wirkstoffen dienen. Hierbei ist ein detailliertes Verständnis der Wechselwirkung von Solubilisat und Amphiphil sowohl für eine quantitative Prognose von Solubilisierungseigenschaften, als auch im Hinblick auf mögliche neuartige Anwendung notwendig.

Im Falle von Solubilisierungsprozessen konnte insbesondere auf die Bedeutung der Biegesteifigkeit k_c hingewiesen werden. Diese ist für das Verhalten von Vesikeln in porösen Materialien wie der Bodenmatrix sowie bei Prozessen an Phasengrenzflächen relevant. Ziel zukünftiger Arbeiten könnte eine Quantifizierung derartiger Einflüsse sein. Auf diesem Wege sollte es möglich sein, für spezielle Anwendungen vesikuläre Aggregate maßzuschneidern, die in der Lage sind, selektiv Komponenten eines lipophilen Gemisches zu solubilisieren.

Die Permeationseigenschaften sind zudem für medizinische Anwendungen relevant. Mittels lipophiler Solubilisate sollte es möglich sein, die Biegesteifigkeit von Vesikeln derart zu erniedrigen, daß ein Durchdringen der Poren der Haut ermöglicht wird. Wirkstoffe wie Insulin könnten auf diese Weise ohne Injektion in den Organismus appliziert werden.

Aber auch schaltbare Systeme, die gezielt Wirkstoffe freisetzen, sind von großem wissenschaftlichen Interesse. Auf der Basis hautverträglicher liposomal gebundener Chromophore könnten Kapselmaterialien generiert werden, die nach dem Auftragen auf der Haut, je nach Intensität des Sonnenlichts dosiert Wirkstoffe beispielsweise zum Schutz vor Hautalterungen freisetzen.

9 Material und Methoden

9.1 Reinigung der verwendeten Chemikalien

9.1.1 Wasser

Das bei den Versuchen verwendete Wasser (Seralpur) mit einem pH-Wert von 6.0 wurde zur Vermeidung bakterieller Kontamination unter Verwendung eines Membranfilters mit einer Porengröße von 0.2 μm (Minisart, Sartorius) steril filtriert. Im Anschluß wurde gelöster Sauerstoff durch mehrmaliges Entgasen und Belüften mit Argon entfernt.

9.1.2 2,2'-Azobis(2-methylpropionitril) AIBN

2,2'-Azobis(2-methylpropionitril) wurde durch Kristallisation aus Methanol gereinigt.

9.1.3 Monomere für die Polymerisation

Die Monomere für die Polymerisation wurden zur Reinigung unter Vakuum destilliert und bis zur Verwendung unter Argon bei -18°C aufbewahrt.

9.2 Methoden zur Vesikeldarstellung

Die Vesikel wurden je nach Größe und Homogenität nach folgenden Präparationsmethoden dargestellt.

9.2.1 Darstellung kleiner unilamellarer Vesikel (SUV) mit Hilfe der Ultraschallmethode

Die Darstellung kleiner unilamellarer Vesikel erfolgte gemäß der Ultraschallmethode [28]. Phosphatidylcholin (DMPC bzw. DPPC) wurde in einem Reaktionsgefäß nach Schlenck in Wasser dispergiert. Im Anschluß wurde die Dispersion für etwa 60 Minuten unter Argon bei einer Temperatur 10°C oberhalb der Phasenumwandlungstemperatur T_m in einem Ultraschallbad (Sonorex TK 52, Bandelin) behandelt, bis eine klare, leicht opaleszente Flüssigkeit entstanden war.

9.2.2 Darstellung großer Vesikel mit Hilfe der Extrudertechnik (LUVET)

Eine wäßrige Dispersion des Phosphatidylcholins wurde mit Hilfe zweier gasdichter Spritzen 20 mal durch die Polycarbonatmembran eines Extruders (LiposoFast, Avestin Inc.) gepreßt. Hierbei wurde der Extruder auf eine Temperatur 10°C oberhalb T_m temperiert. Bei der Präparation kamen unterschiedliche Membranen mit Porengrößen von 100 nm, 200 nm bzw. 400 nm zum Einsatz. Die anschließende Lagerung der Vesikel erfolgte ebenfalls bei einer Temperatur 10°C oberhalb T_m . Die mikroskopische Untersuchung zeigte Vesikel in homogener Verteilung.

Der Verlust an Phospholipid durch Rückstände an der Polycarbonatmembran wurde für verschiedene Konzentrationen durch Bestimmung der Massendifferenz der Membran vor und nach der Verwendung ermittelt. Diese lag in jedem Fall deutlich unterhalb eines Massenverlustes von 2 %. Eine entsprechende Korrektur der effektiven Konzentration wurde jeweils vorgenommen.

9.2.3 Darstellung von Riesenvesikeln

9.2.3.1 Quellmethode nach Reeves und Dowben

Phosphatidylcholin wurde in Chloroform gelöst und in einen Spitzkolben gefüllt. Das Lösungsmittel wurde unter leichter Rotation des Gefäßes zunächst mit Hilfe eines Argonstroms bei einer Temperatur oberhalb der Phasenumwandlungstemperatur T_m entfernt. Die vollständige Abtrennung des Lösungsmittels erfolgte über einen Zeitraum von 6 Stunden unter Vakuum (20 hPa). Auf diese Weise entstand ein gleichmäßiger, farbloser Lipidfilm. Dieser wurde im Anschluß mit Wasser bis zur jeweiligen Konzentration versetzt und zur Quellung für 24 Stunden auf eine Temperatur von 10°C oberhalb T_m temperiert. Der entstandene milchig weiße Film wurde über einen Zeitraum von 3 Stunden bei gleicher Temperatur mit Hilfe eines Schüttlers (Gerhardt) vollständig dispergiert.

9.2.3.2 Elektropräparation

Ein Volumen von 3 μL einer Stammlösung von Dimyristoylphosphatidylcholin in Chloroform ($c = 1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) wurde unter Schutzgas bei 35°C auf ein mit Indium-Zinnoxid beschichtetes Glas (FLC Optics AB, Göteborg) gespreitet. Zur vollständigen Entfernung des Lösungsmittels wurde das Glas 3 Stunden in ein evakuiertes Gefäß eingebracht. Hierdurch wurde ein gleichmäßiger dünner Film des Lipids erhalten. Das Glasplättchen wurde nun derart in die wassergefüllte Reaktionskammer eingesetzt, daß der Lipidfilm vollständig benetzt war. Die Reaktionskammer wurde verschlossen, auf 35°C temperiert und auf dem Objektisch eines Auflichtmikroskops befestigt. Nach Anbringen der Elektroden erfolgte nach einer 30-minütigen stromlosen Quellphase die Quellung im elektrischen Wechselfeld. Hierzu wurde die Spannung sukzessive auf $3 \text{ V} \cdot \text{cm}^{-1}$ bei konstanter Frequenz von 10 Hz erhöht und 2 Stunden konstant gehalten. Durch Herabsetzen der Frequenz und leichtes Schwenken der Reaktionskammer wurden die entstandenen Vesikel anschließend vorsichtig von der Glasoberfläche abgelöst und in eine temperierte Küvette (Hellma) zur mikroskopischen Untersuchung überführt.

9.3 Experimentelle und analytische Methoden

9.3.1 Protonenresonanzspektroskopische Untersuchung

Die Protonenresonanzspektren wurden mit einem Varian-Spektrometer (Gemini XL 200) bei einer Meßfrequenz von 200 MHz und einer Scanzahl von 32 in D₂O aufgenommen. Als innerer Standard fungierten die undeuterten Anteile des deuterierten Lösungsmittels.

9.3.1.1 Allgemeine Präparationsmethode

Die Untersuchung der Lokalisierung aromatischer Solubilisate wurde unter Verwendung kleiner unilamellarer Vesikel mit einem mittleren Durchmesser von etwa 50 nm durchgeführt. Die Darstellung erfolgte mit Hilfe der Ultraschallmethode gemäß 9.2.1. Die Konzentration von Phosphatidylcholin (DMPC bzw. DPPC) betrug 10 mmol · L⁻¹. Als Lösungsmittel fungierte D₂O (99.9 %ig) anstelle von Wasser. Aliquote der Vesikeldispersion von jeweils 1 mL wurden in ein trockenes NMR-Röhrchen eingebracht und dieses mit einem Septum gasdicht verschlossen. Im Anschluß erfolgte die Titration mit dem jeweiligen Solubilisat bei einer Temperatur von 25°C unter Verwendung einer gasdichten Spritze (Hamilton).

9.3.2 Röntgendiffraktometrie vollständig hydratisierter lamellarer Phasen

Die Röntgenstreuexperimente erfolgten unter Verwendung eines Siemens Röntgendiffraktometers D5000 und eines Siemens Kristalloflex-Generators. Dieser erzeugt mittels eines Quarzmonochromators Strahlung der Wellenlänge $\lambda = 0.15406$ nm (Cu-K _{α}). Als Detektor fungierte ein Szintillationsdetektor (Siemens). Die Meßdaten wurden mit einem Personalcomputer (PC 486) und der Software Diffrag erfaßt.

9.3.2.1 Allgemeine Präparationsmethode

Jeweils 9.0 mg Dimyristoylphosphatidylcholin wurden oberhalb der Phasenumwandlungstemperatur T_m mit 40 Gew.-% Wasser hydratisiert, in einem 2 mm · 80 mm Markröhrchen mit Toluol versetzt und vermischt. Das Röhrchen wurde hermetisch verschlossen und in den Probenhalter eingebracht. Die jeweilige Dichte der Dispersionen wurde pyknometrisch bestimmt.

Die röntgenografische Untersuchung erfolgte bei einer Temperatur von $25 \pm 1^\circ\text{C}$ mit einer Scangeschwindigkeit von $2.5^\circ \cdot \text{h}^{-1}$. Der jeweilige Blindwert des Probenröhrchens wurde mit Hilfe der Software Origin 5.0 von den Spektren subtrahiert.

9.3.3 Fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen

Die fluoreszenzspektroskopischen Untersuchungen erfolgten unter Verwendung eines Spektrofluorimeters (JY 3, Jobin Yvon) bei einer Anregungswellenlänge von 338 nm (Bandbreite 4 nm).

9.3.3.1 Allgemeine Präparationsmethode

Pyren wurde unter Erwärmen im Ultraschallbad in einer Konzentration von $c = 2.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ in Wasser gelöst und die Lösung 6 Stunden mit Argon gespült. Die Darstellung der Vesikel erfolgte nach Dispergieren des Phospholipids in der wäßrigen Pyrenlösung. Die klare, leicht opaleszente Dispersion wurde unter Schutzgas in eine Quarzküvette mit einer Schichtdicke von $d = 1 \text{ cm}$ überführt und mit einem Septum gasdicht verschlossen. Anschließend erfolgte die Titration mit dem jeweiligen lipophilen Solubilisat bei konstanter Temperatur von 25°C unter Verwendung einer gasdichten Spritze (Hamilton).

9.3.4 Dynamische Differenzkalorimetrie (DSC)

Die kalorimetrischen Messungen erfolgten unter Verwendung eines leistungskompensierenden, dynamischen Differenzkalorimeters isoperiboler Betriebsart (DSC-2, Perkin Elmer), wobei Wasser bzw. Luft als inerte Referenz diente. Die Messung wurde mit einer Heizrate von $5 \text{ K} \cdot \text{min}^{-1}$ und einer Empfindlichkeit von $20.9 \text{ mJ} \cdot \text{s}^{-1}$ durchgeführt. Die Meßwertaufnahme erfolgte über ein Voltmeter mit IEEE488 Schnittstelle, die eine Übertragung zu einem Computer (Mega ST2, Atari) zur Datenauswertung erlaubt. Zur Ermittlung der molaren Enthalpie der Phasenumwandlung wurde mit Indium als Standard kalibriert. Die Bestimmung der Peakfläche erfolgte durch Integration unter Verwendung der Software Origin 5.0 (Microcal).

9.3.4.1 Allgemeine Präparationsmethode

Das jeweilige zu untersuchende Lipid wurde zunächst in Wasser in einer Konzentration von $c = 30 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ dispergiert und die entsprechenden Vesikel gemäß Abschnitt 9.2 dargestellt. Von dieser Dispersion wurden im folgenden Aliquote entnommen, mit der jeweiligen lipophilen Substanz bis zum festgesetzten Molverhältnis versetzt und homogenisiert. Eine bekannte Menge dieses Gemisches (üblicherweise 15 - 30 mg) wurde in den Probenbehälter, einem Großraumpfännchen aus Edelstahl mit einem Volumen von $60 \mu\text{L}$ (Perkin Elmer) eingefüllt und dieses hermetisch verschlossen.

9.3.4.2 Darstellung kristalliner L_c -Phasen

Zur Darstellung von Vesikeln in der L_c -Phase wurden diese nach 9.3.4.1 vorbereitet, 7 Tage in einem gasdichten Probengefäß auf 2°C temperiert und anschließend vermessen.

9.3.5 Video-Kontrastverstärkungs-Mikroskopie

Die mikroskopischen Untersuchungen erfolgten routinemäßig unter Verwendung eines BH-2 Durchlichtmikroskops (Olympus Optical Company) unter Verwendung eines Ölimmersionskondensors sowie eines Ölimmersionsobjektivs mit 60-facher Vergrößerung ($N.A. = 1.4$). Die Bildaufnahme erfolgte durch Projektion des Zwischenbildes mit Hilfe eines Zoomokulars (6.5-fach) auf den CCD-Chip einer hochauflösenden Schwarzweiß-Videokamera (CF 8/1, Kappa) unter anschließender Echtzeit-Bildbearbeitung mit Hilfe eines Bildprozessors (Argus 20, Hamamatsu). Die Bildfolgen wurden mit Hilfe eines S-VHS Videorekorders aufgezeichnet und auf einen Monitor (HR Trinitron PVM 1454 QM, Sony) ausgegeben.

9.3.5.1 Allgemeine Präparationsmethode

Die Darstellung der DPPC-Vesikel ($c = 1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) erfolgte mit Hilfe der Quellmethode gemäß 9.2.3.1 bei einer Temperatur von 45°C . Die Zugabe der entsprechenden Menge der lipophilen Substanz erfolgte durch Mischen in einer Bördelflasche mit Septum (Merck) unter anschließender Temperierung auf die Beobachtungstemperatur. Die mikroskopische Untersuchung erfolgte unter Verwendung einer Mikroküvette aus Quarzglas (Hellma) bei konstanter Temperatur.

9.3.6 Bestimmung der elastischen Eigenschaften

Die Bestimmung der elastischen Konstanten erfolgte mit Hilfe eines Durchlichtmikroskops BX-50 (Olympus Optical Company) unter Verwendung eines Phasenkontrastobjektivs mit 40-facher Vergrößerung, $NA = 0.75$ (Ph 2, Olympus Optical Company). Das Mikroskop wurde zur Vermeidung des Einflusses externer Schwingungen auf eine hierzu konstruierte schwingungsgedämpfte Grundplatte montiert. Die variable Nachvergrößerung erfolgte durch Kombination eines 5-fach Zoomokulars mit einem Vergrößerungswechsler. Das Kamerasystem bestand aus einer hochauflösenden digitalen CCD-Kamera („lens-on-chip“-Technologie) mit Peltierkühlung (Sensi Cam, Super VGA, PCO). Die Bildübertragung zu einem Personal Computer (Pentium II, 233 MHz) erfolgte digital mit einer Graustufentiefe von 12 Bit.

Die digitale Bildbearbeitung und -verarbeitung erfolgte unter Verwendung der kommerziellen Bildverarbeitungssoftware Optimas 6.0 für Windows 95 (Stemmer Imaging, Weinheim). Die integrierte Makrosprache in C erlaubte hierzu eine Automatisierung der einzelnen Bildbearbeitungsschritte. Die Bilder der Bildfolgen (üblicherweise 200 - 400 Einzelbilder) wurden nacheinander der Bildbearbeitung sowie der anschließenden Bildanalyse zugeführt. Die Konturerkennung erfolgte mit Hilfe des in Optimas implementierten Algorithmus nach Lui [96]. Die Konturdaten wurden als Dateninput für die theoretische Auswertung zur Ermittlung der elastischen Konstanten verwendet.

Die nachfolgende Analyse erfolgte mit Hilfe eines hierzu entwickelten Programmes in C++ (Borland) auf einem Personal Computer (Pentium II, 233 MHz).

9.3.6.1 Allgemeine Präparationsmethode

Jeweils 0.695 mg L- α -Dimyristoylphosphatidylcholin wurden in 200 μ L Chloroform gelöst und in eine 1.5 mL Bördelflasche (Merck) eingefüllt. Die Darstellung der Vesikel erfolgte unter Verwendung der Quellmethode gemäß 9.2.3.1 ($c_{\text{DMPC}} = 1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$). Nach Zugabe von Toluol wurde das Gefäß gasdicht verschlossen. Der milchig weiße Film wurde über einen Zeitraum von 3 Stunden mit Hilfe eines Schüttlers bei einer Temperatur von 30°C dispergiert und die Dispersion erneut 24 Stunden temperiert.

Zur mikroskopischen Untersuchung wurde ein Aliquot vorsichtig entnommen und in eine auf 30°C temperierte, runde Mikroküvette aus Quarzglas (Hellma) mit einem Volumen von 36 μ L und einer Schichtdicke von 0.2 mm eingefüllt. Die Küvette wurde durch Aufsetzen eines Deckglases ($d = 0.17 \text{ mm}$) verschlossen und in die Objektkammer eines temperierbaren Objektisches eingebracht. Die videomikroskopische Untersuchung der Fluktuationsamplituden von DMPC-Vesikeln erfolgte bei konstanter Temperatur von 30°C nach einer Relaxationszeit von etwa 3 Stunden nach Einfüllen der Vesikel in die Objektkammer.

9.3.7 Ermittlung der effektiven Toluolkonzentration in DMPC-Vesikeln

Die photometrischen Untersuchungen erfolgten mittels UV/VIS-Spektrophotometer Cary 1E (Varian). Die Meßdaten wurden mit Hilfe eines Personalcomputers (PC 386) aufgenommen.

9.3.7.1 Allgemeine Präparationsmethode

Eine Dispersion multilamellarer Vesikel wurde gemäß 9.2.3.1 in einer Konzentration von $c = 1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ dargestellt. Aliquote dieser Dispersion wurden in Bördelflaschen (Merck) überführt, mit Toluol entsprechend den molaren Verhältnissen der mikroskopischen Untersuchungen versetzt und gasdicht verschlossen. Die Proben wurden über einen Zeitraum von 30 Minuten mit Hilfe eines Schüttlers (Gerhardt) intensiv durchmischt und für etwa 4 Stunden bei 30°C gelagert. Die Dispersion wurde im Anschluß zur Abtrennung der Vesikelphase 60 Minuten bei 20000 g unter Verwendung einer temperaturkontrollierten Zentrifuge (Beckman J2-HS) bei einer Temperatur von 30°C zentrifugiert. Der wäßrige Überstand wurde mit einer gasdichten Spritze (Hamilton) entnommen und in eine mit einem Septum versehene Quarzküvette (1 mL Schichtdicke) überführt. Die Ermittlung der Toluolkonzentration erfolgte photometrisch durch Bestimmung der Absorption des Toluol bei einer Wellenlänge von 361 nm. Kalibriert wurde mit einer entsprechenden Lösung von Toluol in Wasser (Abbildung 9-1).

Zur Überprüfung der vollständigen Abtrennung der Vesikelphase wurde die Lösung auf etwa 5°C abgekühlt, über einen ebenfalls kalten Membranfilter mit einer Porengröße von 20 nm filtriert und der erneuten Konzentrationsbestimmung zugeführt. Hierbei ergaben sich insbesondere im Bereich hoher Toluolkonzentrationen Abweichungen, da in diesem Bereich die Vesikel aufrahmen und nicht durch Zentrifugation abtrennbar sind.

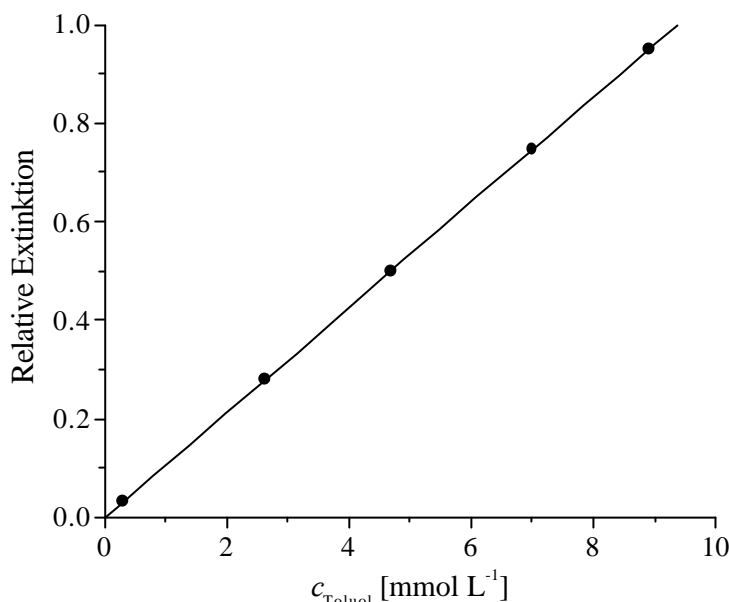


Abbildung 9-1: Kalibrierung zur Bestimmung der Toluolkonzentration in einer wässrigen Lösung bei einer Absorptionswellenlänge von 361 nm (Auflösung: 0.2 nm, Scanrate: 0.033 s nm⁻¹).

9.3.8 Dynamik des Einbaus lipophiler Solubilisate in die Vesikelmembran

Die Untersuchung des Einbaus lipophiler Solubilisate in die Vesikelmembran erfolgte mit Hilfe eines Durchlichtmikroskops BX-50 (Olympus Optical Company) unter Verwendung eines Phasenkontrastobjektives 40-facher Vergrößerung, N.A. = 0.75 (Ph 2, Olympus Optical Company).

9.3.8.1 Allgemeine Präparationsmethode

Eine Dispersion riesiger DMPC-Vesikel wurde unter Verwendung der Quellmethode gemäß 9.2.3.1 ($c_{\text{DMPC}} = 1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) dargestellt und in eine runde Mikroküvette aus Quarzglas (Hellma) mit einem Volumen von 36 μL und einer Schichtdicke von 0.2 mm eingefüllt. Die Küvette wurde in die Objektkammer eines temperierbaren Objektisches eingebracht und auf 30°C erwärmt. Anschließend wurde ein Toluoltropfen ($V = 5 \mu\text{L}$) zudosiert und die Küvette durch Aufsetzen eines Deckglases ($d = 0.17 \text{ mm}$) zur mikroskopischen Untersuchung hermetisch verschlossen.

9.3.9 Untersuchung der Solubilisierungsrate

Die mikroskopischen Untersuchungen der Solubilisierungsraten erfolgten mit Hilfe eines BX-50 Auflichtmikroskops (Olympus Optical Company) unter Verwendung eines Trockenobjektives 40-facher Vergrößerung, N.A. = 0.75 (Ph 2, Olympus Optical Company). Die Bestimmung der Grenzflächenspannung wurde mit einem optischen Kontaktwinkelmeßgerät (OCA 20, DataPhysics) durchgeführt.

9.3.9.1 Allgemeine Präparationsmethode

Die jeweilige Vesikeldispersion ($c = 10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) wurde mit Hilfe der Extrudertechnik gemäß Abschnitt 9.2.2 unter Verwendung einer Polycarbonatmembran mit einer Porengröße von 200 nm hergestellt. Ein Aliquot dieser Dispersion wurde in eine speziell konstruierte Teflon-Mikrokammer ($V = 170 \text{ } \mu\text{L}$) eingefüllt, diese verschlossen und in die Objektkammer des temperierbaren Objektisches eingebracht. Nach Temperierung auf die gewünschte Untersuchungstemperatur wurde mit Hilfe einer Spritze (Hamilton) $1 \text{ } \mu\text{L}$ des in wäßriger Lösung emulgierten Öls zugegeben. Die Verdünnung des Öls wurde hierbei so klein gewählt, daß im Reaktionsraum möglichst wenig (d.h. maximal 3 bis 5) Tropfen vorlagen. Die mikroskopische Untersuchung eines einzelnen, frei beweglichen Tropfens erfolgte unmittelbar nach dem Einfüllen. Hierzu wurden Bildfolgen in einem Intervall von 1 s - 10 s digital aufgenommen und auf einem Personal Computer (Pentium II, 233 MHz) gespeichert. Die Auswertung der Tropfengeometrie erfolgte unter Verwendung der Software Optimas 6.0 (Stemmer Imaging, Weinheim). Die zeitabhängige Abnahme des Tropfenradius wurde durch Ermittlung des äquivalenten Radius der Kreisfläche der zweidimensionalen Projektion des Tropfens bestimmt.

Eine Dispersion kleiner unilamellarer Vesikel ($c = 1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) wurde gemäß 9.2.1 dargestellt und ein Aliquot von 5 mL in eine Küvette (Hellma) eingefüllt. In diese wurde ein Hexadekantropfen ($V = 16 \text{ } \mu\text{L}$) innerhalb einer Sekunde über eine Kapillare eingebracht und die Grenzflächenspannung des an der Kapillare adsorbierten Tropfen als Funktion der Zeit bestimmt.

9.3.10 Schwesterchromatidenaustausch-Test (SCE)

Die Kultivierung der Zellen erfolgte unter Verwendung eines Brutschranks (Heraeus, Hanau) mit CO_2 -Atmosphäre. Die Zentrifugation der Zellen wurde in einer Zentrifuge (Heraeus, Hanau) durchgeführt. Die mikroskopischen Untersuchungen erfolgte mit Hilfe eines BX-50 Durchlichtmikroskops (Olympus) und einem Ölimmersionsobjektiv 100-facher Vergrößerung, N.A. = 1.4.

9.3.10.1 Allgemeine Präparationsmethode

Alle Experimente wurden zur Vermeidung von Kontaminationen unter keimfreien Bedingungen in einem Sterilraum unter einer Sterilwerkbank (Heraeus, Hanau) durchgeführt. Glasgeräte wurden in einem Trockenschrank bei 180°C zweimalig sterilisiert, hitzeempfindliche Materialien wurden in einem Autoklaven (Varioklav) 50 Minuten bei 120°C autoklaviert. Alle weiterhin verwendeten Materialien wurden vor dem Gebrauch mit Ethanol (70 %ig) gewaschen.

9.3.10.2 Verwendete Wasch- und Inkubationsmedien

Alle verwendeten Lösungen wurden durch einen Sterilfilter mit einer Porengröße von 0.1 µm filtriert, um auch Mykoplasmen zurückzuhalten. Folgende Medien wurden verwendet:

9.3.10.2.1 Vollmedium

Vollmedium wurde jeweils frisch angesetzt. Dieses bestand zu 90 % aus McCoy's 5A-Medium und zu 10 % aus fötalem Kälberserum (FKS). Zusätzlich wurden die Antibiotika Penicillin (100 Einheiten pro mL) und Streptomycin ($100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) zur Vermeidung bakterieller Kontamination zugesetzt.

9.3.10.2.2 PBS (phosphate buffered saline)

PBS bezeichnet eine Ca^{2+} - und Mg^{2+} -freie phosphatgepufferte Salzlösung folgender Zusammensetzung:

$\text{NaCl } c = 137 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, $\text{KCl } c = 2.7 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \text{ } c = 8.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$,
 $\text{KH}_2\text{PO}_4 \text{ } c = 1.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ mit einem pH-Wert von 7.35.

9.3.10.2.3 Trypsin/EDTA-Lösung

Die Trypsin/EDTA-Lösung bestand aus 0.05 % Trypsin, einem proteolytisch aktiven Enzym, das die Ablösung fixierter Zellen ermöglicht sowie 0.02 % EDTA gelöst in PBS.

9.3.11 Kultivierung der CHO-Zellen

Zur Untersuchung wurden Zellen des Typs CHO-9 des chinesischen Hamsters *Cricetulus griseus* verwendet. Die Lagerung der Zellen erfolgte bei -80°C. Aufgetaute Zellen wurden kultiviert und nach etwa 40 Passagen verworfen. Unter optimalen Bedingungen dauerte ein Zellzyklus etwa 14 Stunden. Die Kultivierung der CHO-Zellen erfolgte unter Verwendung steriler Kunststoff-Petrischalen (Greiner, Nürtingen) mit einem Durchmesser von 96 mm in einem Brutschrank (Heraeus, Hanau) bei 37°C, 5 % CO_2 -Atmosphäre und 95 % wasserdampfgesättigter Luft. Das sterile Kulturmedium wurde in regelmäßigen Abständen zur Gewährleistung eines ungestörten Wachstums der Zellen gewechselt. Alle zwei bis drei

Tagen erfolgte bei vollständiger Monoschichtbelegung der Bodenfläche der Petrischale eine Subkultivierung.

9.3.12 Passagieren der Zellen

Das Passagieren der Zellen umfaßte folgende Arbeitsschritte:

Die jeweiligen Zellkulturen wurden zunächst makroskopisch und mikroskopisch beurteilt, im Anschluß das Kulturmedium abgegossen und die Monoschichten mit 2 - 3 mL PBS gespült. Nach Übersichtung der Zellen für 2 - 3 Minuten mit einem dünnen Film Trypsin/EDTA-Lösung wurde die Trypsinwirkung mit 2 mL Vollmedium abgestoppt. Die Zellen wurden mit einer Pasteurpipette abgespült und suspendiert. Jeweils 250 - 350 μL Zellsuspension wurden je Kulturschale verwendet und die Zellen anschließend im Brutschrank bei 37°C, 5 % CO_2 -Atmosphäre kultiviert.

9.3.13 Behandlung der CHO-Zellen

Auf eine Synchronisation der Zellkulturen vor der Behandlung wurde verzichtet. Die Zellen wurden 18 Stunden vor Behandlungsbeginn subkultiviert und in Petrischalen eingesäht. Hierbei wurde die Zelldichte so gewählt, daß sich die Kultur während der Behandlung in exponentiellem Wachstum befand und bei Beendigung der Kultur eine hohe mitotische Aktivität vorlag. Für diesen Zeitraum wurde den Zellkulturen für die SCE-Bestimmung BrdUrd in einer Konzentration von $c = 2 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ zugesetzt. Die Zelldichte wurde mit Hilfe einer Zählkammer nach Neubauer auf $1 \cdot 10^7$ Zellen je Petrischale bestimmt.

9.3.14 Präparation der Behandlungslösung

Die Behandlungslösungen wurden unmittelbar vor Versuchsbeginn frisch zubereitet. Die zu untersuchende Substanz wurde in der gewünschten Konzentration zu 3 mL Vollmedium in einer 3 mL-Bördelflasche (Merck) gegeben und hermetisch verschlossen. Die Lösung wurde im Anschluß über einen Zeitraum von 30 Minuten bei einer Temperatur von 35°C mit Hilfe eines Schüttlers (Gerhardt) gleichmäßig durchmischt.

9.3.15 Präparation der Vesikeldispersion

Dimyristoylphosphatidylcholin wurde unter Verwendung von Vollmedium in der entsprechenden Konzentration von $c = 1 - 10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ dispergiert. Für die Untersuchungen wurden kleine unilamellare (SUV) sowie große unilamellare Vesikel (LUV) eingesetzt. Große Vesikel wurden hierzu mit Hilfe der Extrudermethode gemäß Abschnitt 9.2.2 unter Verwendung zweier gestapelter Polycarbonatmembranen mit einer Porengröße von 100 nm und 200 nm dargestellt. Die Überführung der Dispersion in kleine unilamellare Vesikel erfolgte mit Hilfe der Ultraschallmethode gemäß Abschnitt 9.2.1.

Nach Aliquotierung wurde die jeweilige lipophile Substanz in der gewünschten Konzentration zu der Vesikeldispersion gegeben und über einen Zeitraum von 30 Minuten bei einer Temperatur von 35°C mit Hilfe eines Schüttlers gleichmäßig durchmischt. Die Vesikeldispersion wurde über ein Membranfilter mit einer Porengröße von 0.2 µm (Minisart, Sartorius) steril filtriert.

9.3.16 Behandlung der Zellen

Die Behandlung der Zellen erfolgte im konfluenten Zustand und umfaßte folgende Arbeitsschritte:

Zunächst wurde das Kulturmedium entfernt und die Zellen mit serumfreien Medium gewaschen. Nach Zugabe von 3 ml der Behandlungslösung mit unterschiedlicher Konzentration der Testsubstanz folgte eine Inkubation über 2 Stunden. Im Anschluß wurde die Behandlungslösung entfernt, die Zellen dreimal mit serumfreien Medium gewaschen und mit Vollmedium überschichtet. Die Erholungszeit nach der Exposition betrug für alle Experimente 18 Stunden und erfolgte im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO₂ und begann mit dem Auswaschen der Behandlungslösung. Die Zellen erhielten während der Erholungszeit kein BrdUrd.

9.3.17 Aufarbeitung der behandelten Zellkulturen

Zwei Stunden vor Beginn der Aufarbeitung wurde den Zellen 0.08 µg · mL⁻¹ des Spindelgifts Colcemid zugesetzt. Die induzierten C-Metaphasen erlauben eine verlässliche Analyse struktureller Chromosomenveränderungen. Die Aufarbeitung unter nicht sterilen Bedingungen umfaßte folgende Arbeitsschritte. Die lose haftenden mitotischen Zellen wurden mittels Pasteurpipette in ein Zentrifugenröhrchen überführt und 5 Minuten bei 120 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und die Zellen mit 5 ml einer hypotonen 1%igen Natriumcitratlösung 8 Minuten bei 37°C überschichtet. Nach erneuter Zentrifugation und Absaugen des Überstandes wurde zweimal tropfenweise ein Gemisch aus Methanol und Eisessig im Verhältnis 3:1 (Fixativ) zugegeben. Anschließend wurde jeweils zentrifugiert und der Überstand verworfen. Am Ende der Fixierung wurde der Zellüberstand in Abhängigkeit von der Größe des Zellpellets bis auf etwa 0.5 mL entfernt und das Zellpellet mit Hilfe einer Pasteurpipette suspendiert. Diese Zellsuspension wurde im Anschluß auf die kalte, feuchte und fettfreie Oberfläche eines Objektträger aufgetropft. Die so angefertigten Präparate wurden über 24 Stunden im Trockenschrank bei 37°C getrocknet.

9.3.18 FPG-Färbung der Präparate

Die FPG-Färbung (Fluoreszenz-**plus**-Giemsa) erfolgte nach folgendem Verfahren:

Die getrockneten Präparate wurden 20 Minuten in $4.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ einer wässrigen Lösung des Fluoreszenzfarbstoffes Hoechst 33258 (Bisbenzimid) eingebracht. Nach mehrmaligem Spülen der Objektträger mit destilliertem Wasser und PBS wurden diese eingedeckelt und 20 Minuten auf einer Heizplatte bei 60°C mit Schwarzlicht bestrahlt. Nach Entfernen der Objektträger wurden die Präparate erneut mit destilliertem Wasser gespült und unter Verwendung einer wässrigen Giemsalösung (5 % Giemsafrablösung, 20 % Phosphatpuffer) bei pH 6.8 10 Minuten gefärbt. Im Anschluß wurde mit destilliertem Wasser gespült und an der Luft getrocknet.

9.3.19 Auswertung

Die Auswertung der Chromosomenpräparate erfolgte lichtmikroskopisch. Für eine hinreichend genaue statistische Auswertung wurden pro Behandlungspunkt 50 vollständig differentiell gefärbte Metaphasen mit 20 - 22 Chromosomen auf SCE ausgewertet. Als SCE wurde hierzu ein Farbwechsel auf einer Chromatide von hell nach dunkel und umgekehrt gewertet. Die SCE aller Chromosomen einer Metaphase entsprechen den SCE pro Zelle.

9.3.19.1 Statistische Auswertung

Die Analyse der Meßdaten auf statistisch signifikante Unterschiede erfolgte mit Hilfe des Student's t -Test für unabhängige Stichproben. Bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit kleiner als 5 % ($p < 0.05$) gelten die verglichenen Mittelwerte als signifikant unterschiedlich.

9.3.20 Polymerisation in Phosphatidylcholin-Vesikeln

Die Untersuchung der Polymerisation lipophiler Monomere in der Doppelschicht riesiger Vesikel erfolgte mit Hilfe der Videomikroskopie. Hierzu kam ein BX-50 Durchlichtmikroskop in Kombination einer Auflichtfluoreszenzeinrichtung mit Konversionslinse (Olympus Optical Company) zum Einsatz. Die Anregung erfolgte im UV-Bereich mit einer 100 W Quecksilber-Hochdrucklampe sowie einem Standardmodul, das aus einem Breitbandanregungsfilter ($I_{\text{Anregung}} = 330 - 385 \text{ nm}$), einem dichroitischen Teilerspiegel (DM400) und einem Sperrfilter ($I_{\text{Sperr}} = 420 \text{ nm}$) bestand.

Die Charakterisierung der Polymerisationsprodukte in großen unilamellaren Vesikeln erfolgte mit Hilfe der dynamischen Differenzkalorimetrie sowie der Protonenresonanzspektroskopie. Die kalorimetrischen Untersuchungen erfolgten unter Verwendung eines dynamischen Differenzkalorimeters (DSC-2, Perkin Elmer). Die Protonenresonanzspektren wurden mit Hilfe eines Varian-Spektrometers (Gemini XL 200) bei einer Meßfrequenz von 200 MHz durchgeführt.

9.3.20.1 Allgemeine Präparationsmethode

Phosphatidylcholinvesikel wurden mit der Quellmethode gemäß 9.2.3.1 (bzw. der Extrudertechnik gemäß 9.2.2) in einer Konzentration von $c = 1$ (bzw. 10) $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ dargestellt und in einem Reaktionsgefäß ($V = 3 \text{ mL}$) unter Inertgasatmosphäre auf 10°C oberhalb der Phasenumwandlungstemperatur temperiert.

Ein Volumen von 1 mL des äquimolaren Monomerengemisches, bestehend aus einem reaktiven Monomer und einem Quervernetzer, wurde unter Inertgasatmosphäre mit einer Spatelspitze AIBN versetzt. Als Monomer fungierte ein Gemisch aus Styrol und *p*-Divinylbenzol bzw. Methacrylsäurebutylester und Ethylenglycoldimethacrylat.

Ein Aliquot dieser Lösung wurde zu der Vesikeldispersion in einem Gewichtsverhältnis von 1:1 gegeben und unter Rühren über einen Zeitraum von 6 Stunden equilibriert. Durch Steigerung der Temperatur auf etwa 60°C wurde die Reaktion gestartet und das Reaktionsgemisch weitere 6 Stunden auf 60°C temperiert. Die trübe Dispersion wurde mikroskopisch untersucht. Durch vorsichtige Zugabe von Methanol und anschließende Zentrifugation wurde das Polymer isoliert, das weiße Pulver anschließend mehrmals mit Methanol gewaschen und nach der Trocknung ebenfalls mikroskopisch untersucht.

9.3.20.2 Kalorimetrische Untersuchungen

Zur Durchführung der kalorimetrischen Untersuchungen wurden DPPC-Vesikel in einer Konzentration von $c = 50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ mit dem jeweiligen Monomerengemisch ($c = 25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) versetzt, in einen Probenbehälter eingebracht und kalorimetrisch untersucht. Im Anschluß wurde die Probe 3 Stunden auf 60°C temperiert und erneut kalorimetrisch untersucht.

9.3.20.3 Protonenresonanzspektroskopische Untersuchung

Die protonenresonanzspektroskopischen Untersuchungen erfolgten unter Verwendung kleiner unilamellarer DMPC-Vesikel (SUV), die gemäß 9.3.1 hergestellt wurden. Ein äquimolares Gemisch von Styrol und Divinylbenzol wurde in einem Gewichtsverhältnis von 1:1 solubilisiert und spektroskopisch untersucht. Nach einer thermisch initiierten Polymerisation über einen Zeitraum von 10 Stunden bei 60°C mit AIBN als Initiator wurde das Reaktionsgemisch erneut protonenresonanzspektroskopisch untersucht.

9.3.20.4 Mikroskopische Untersuchung

Riesige DMPC-Vesikel wurden mit dem Reaktionsgemisch beladen und unter Inertgas in eine Mikroküvette aus Quarzglas (Hellma) eingefüllt und durch Aufsetzen eines Herasil-Deckglases ($d = 0.17$ mm) verschlossen. Die Küvette wurde in die Objektkammer des temperierbaren Objektisches eingebracht und auf 30°C temperiert. Die Beobachtung der Reaktion einzelner unilamellarer Vesikel erfolgte bei gleichzeitiger photochemischer Initiierung unter Verwendung eines Durchlichtmikroskops in Kombination mit einer Auflichtfluoreszenzeinrichtung zur Anregung im UV-Bereich. Die entsprechende Absorptionsbande der Azogruppe des 2,2'-Azobis(2-methylpropionitril) zeigt ein Maximum bei 360 nm.

9.3.21 Beeinflussung der Vesikelmorphologie

Die Untersuchung des Einbaus lipophiler Solubilisate in die Vesikelmembran erfolgte mit einem Durchlichtmikroskop BX-50 (Olympus Optical Company) in Kombination mit einer Auflichtfluoreszenzeinrichtung gemäß 9.3.20 unter Verwendung eines Phasenkontrastobjektives 40-facher Vergrößerung, N.A. = 0.75 (Ph 2, Olympus Optical Company).

9.3.21.1 Allgemeine Präparationsmethode

Die Darstellung riesiger Vesikel erfolgte unter Verwendung einer Lösung von DMPC ($c_{\text{DMPC}} = 1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) und Pyren (10 Mol-%) in Chloroform mittels der in beschriebenen 9.2.3.1 Quellmethode. Die mikroskopischen Untersuchungen erfolgten unter Verwendung einer Mikroküvette aus Quarzglas (Hellma) bei konstanter Temperatur.

10 Literaturverzeichnis

- [1] Barenholz Y., Lasic D. D. *Handbook of Nonmedical Applications of Liposomes*; CRC Press: Boca Raton, **1996**.
- [2] Lasic D. D. *Liposomes: From Physics to Applications*; Elsevier: Amsterdam, **1993**.
- [3] Seifert U., *Adv. Phys.*, **1997**, 46, 13.
- [4] Gregoriadis G. *Liposome Technology*; CRC Press Boca Raton: Florida, **1983**.
- [5] Suwalsky M., Benites M., Villena F., Aguilar F., Sotomayor C. P., *Biochim. Biophys. Acta*, **1996**, 1285, 267.
- [6] Johansson A., Keightley C. A., Smith G. A., Richards C. D., Hesketh T. R., Metcalfe J. C., *J. Biol. Chem.*, **1981**, 4, 1643.
- [7] Jones O. T., Lee A. G., *Biochemistry*, **1985**, 24, 2195.
- [8] Cevc G., Gebauer D., Stiebner J., Schätzlein A., Blume G., *Biochim. Biophys. Acta*, **1998**, 1368, 201.
- [9] Adler-Moore J. P., Proffitt R. T., *Liposome Res.*, **1993**, 3, 429.
- [10] Cevc G., Blume G., Schätzlein A., *J Control. Rel.*, **1997**, 45, 211.
- [11] Lee R. J., Huang L., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, **1997**, 2, 14, 173.
- [12] Harnoy G. N., Gatt S., Barenholz Y. US Patent 4811791, 1989.
- [13] Gatt S., Barenholz Y., H. Bercovier US Patent 5401413, 1995.
- [14] Gatt S., Barenholz Y. US Patent 5244574, 1993.
- [15] Lasic D. D. *On the History of Liposomes* In: *Handbook of Nonmedical Applications of Liposomes*. Volume I; Barenholz Y., Lasic D. D. (Hrsg.); CRC Press: Boca Raton, **1996**.
- [16] Bangham A. D., Standish M. M., Watkins J. C., *J. Mol. Biol.*, **1965**, 13, 238.
- [17] Virchow R., *Virchows Arch. Pathol. Anat. Physiol.*, **1854**, 563, 1854.
- [18] Lehmann O. *Die flüssigen Kristalle*: Leipzig, **1911**.
- [19] Tanford C. *The hydrophobic effect*; Wiley: New York, **1973**.
- [20] Israelachvili J. *Intermolecular & surface forces*, 3. Auflage; Academic Press: London, **1992**.
- [21] Israelachvili J. N., Mitchell D. J., Ninham B. W., *J. Chem. Soc. Faraday Trans. I*, **1976**, 72, 1525.
- [22] Kornberg R. D., McConnell H. M., *Biochem.*, **1972**, 10, 1441.
- [23] Sackmann E., *Ber. Bunsenges. Phys. Chem*, **1974**, 78, 929.
- [24] Chapman D. *Biomembranes*; VCH: Weinheim, **1993**.
- [25] Lewis B. A., Dasgupta S. K., Griffin R. G., *Biochem.*, **1984**, 23, 1988.
- [26] Rand R. P., Chapman D., Larsson K., *Biophys. J.*, **1975**, 15, 117.

- [27] Papahadjopoulos D., Miller N., *Biochim. Biophys. Acta*, **1967**, 135, 639.
- [28] Huang C., *Biochemistry*, **1969**, 8, 344.
- [29] Miyagishi S., Nishida M., *J. Colloid Interface Sci.*, **1980**, 78, 195.
- [30] Hope M. J., Bally M. B., Webb G., Cullis P. R., *Biochim. Biophys. Acta*, **1985**, 812,
- [31] Clerc S. G., Thompson T. E., *Biophys. J.*, **1994**, 67, 475.
- [32] Mayer L. D., Hope M. J., Cullis P. R., Janoff A. S., *Biochim. Biophys. Acta*, **1985**, 817, 193.
- [33] Reeves J. P., Dowben R. M., *J. Cell. Physiol.*, **1969**, 73, 49.
- [34] Angelova M. I., Soleau S., Méléard P., Faucon J. F., Bothorel P., *Progr. Colloid Polym. Sci.*, **1992**, 89, 127.
- [35] Angelova M. I., Soleau S., Méléard P., Faucon J. F., Bothorel P. *AC field controlled formation of giant fluctuating vesicles and bending elasticity measurements* In: *Springer Proceedings in Physics*, Vol 66; Richter D., Kremer K., Lipowsky R. (Hrsg.); Springer Verlag: Berlin, **1992**, Kapitel II; S. 178.
- [36] Elworthy P. H., Florence A. T., Macfarlane C. B. *Solubilization by Surface-Active Agents and its Application in Chemistry and the Biological Sciences*; Chapman & Hall: London, **1968**.
- [37] Mukerjee P. *Solution Chemistry of Surfactants*; Mittal K. L. (Hrsg.); Plenum Press: New York, **1979**; S. 153.
- [38] Quinn P. J., Perrett S. F. *Liposomal Formulations of Agrichemical Pesticides* In: *Handbook of Nonmedical Applications of Liposomes*. Volume IV; Barenholz Y. Lasic D. D. (Hrsg.); CRC Press: Boca Raton, **1996**, Kapitel 10; S. 127.
- [39] McDaniel S. A., Simon S. A., McIntosh T. J., Borovyagin V., *Biochemistry*, **1982**, 21, 4116.
- [40] De Young L. R., Dill K. A., *Biochemistry*, **1988**, 27, 5281.
- [41] Vanderkooi J. M., Fischkoff S., Andrich M., Podo F., Owen C. S., *J. Chem. Phys.*, **1975**, 63, 3661.
- [42] J. R. Schuh, U. Banerjee, L. Müller, S. I. Chan, *Biochim. Biophys. Acta*, **1982**, 687, 219.
- [43] Yashar V. B., Menashe M., Biltonen R. L., Johnson M. L., Barenholtz Y., *Biochim. Biophys. Acta*, **1987**, 904, 117.
- [44] McLaughlin A. C., Podo F., Blaisie J. K., *Biochim. Biophys. Acta*, **1973**, 330, 109.
- [45] Lawaczeck R., Kainosho M., Chan S. I., *Biochim. Biophys. Acta*, **1976**, 443, 313.
- [46] Soma J., Papadopoulos K. D., *J. Colloid Interface Sci.*, **1996**, 181, 225.
- [47] Brückner E., Rehage H., *Progr. Colloid. Polym. Sci.*, **1998**, 109, 21.
- [48] Zimmerman S. C., Wu W., Zeng Z., *J. Am. Chem. Soc.*, **1991**, 113, 196.

- [49] McIntosh T. J., McDaniel R. V., Simon S. A., *Biochim. Biophys. Acta*, **1983**, 731,
- [50] Simon S. A., McIntosh T. J., *Biochim. Biophys. Acta*, **1984**, 773, 169.
- [51] Hauser H., *Chimia*, **1985**, 39, 252.
- [52] Tardieu A., Luzzati V., *J. Mol. Biol.*, **1973**, 75, 711.
- [53] Lei N., Lei X., *Langmuir*, **1998**, 14, 2155.
- [54] Rand R. P., Parsegian V. A., *Biochim. Biophys. Acta*, **1989**, 988, 351.
- [55] Caillé A., *C. R. Acad. Sci B*, **1972**, 274, 891.
- [56] Roux D., Safinya C. R., *J. Phys France*, **1988**, 49, 307.
- [57] Leibler S., *J. Phys. France*, **1986**, 47, 507.
- [58] Barenholz Y., Cohen T., Korenstein R., Ottolenghi M., *Biophys. J.*, **1991**, 59, 110.
- [59] Müller H.-J., Luxnat M., Galla H.-J., *Biochim. Biophys. Acta*, **1986**, 856, 283.
- [60] L'Heureux G. P., Fragata M., *Biophys. Chem.*, **1988**, 30, 293.
- [61] L'Heureux G. P., Fragata M., *J. Colloid Interface Sci.*, **1987**, 117, 513.
- [62] Vekshin N. L., *J. Biochem. Biophys. Methods*, **1987**, 15, 97.
- [63] Galla H.-J., Sackmann E., *Biochim. Biophys. Acta*, **1974**, 339, 103.
- [64] Nakajima A., *Bull. Chem. Soc. Japan*, **1971**, 44, 3272.
- [65] Ham J. S., *J. Chem. Phys.*, **1953**, 21, 756.
- [66] Kalyanasundaram K., Thomas J. K., *J. Am. Chem. Soc.*, **1977**, 99, 2039.
- [67] Dembo M., Glushko V., Aberlin M. E., Sonenberg M., *Biochim. Biophys. Acta*, **1979**, 522, 201.
- [68] Förster T., Kasper K., *Z. Phys. Chem. N.F.*, **1954**, 1, 275.
- [69] Blackwell M. F., Gounaris K., Barber J., *Biochim. Biophys. Acta*, **1986**, 858, 221.
- [70] Biltonen R. L., Lichtenberg D., *Chem. Phys. Lipids*, **1993**, 64, 129.
- [71] Mabrey S., Sturtevant J. M. *High-sensitivity differential scanning calorimetry in the study of biomembranes and related model systems* In: *Methods in Membrane Biology*; Korn E. D. (Hrsg.); Plenum Press: New York, **1978**; Vol. 9, Kapitel 3; S.
- [72] Chen S. C., Sturtevant J. M., Gaffney B. J., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **1980**, 77, 5060.
- [73] McElhaney R. N., *Chem. Phys. Lipids*, **1982**, 30, 229.
- [74] Földner H. H., *Biochemistry*, **1981**, 20, 5707.
- [75] Grünwald B., Stankowski S., Blume A., *FEBS Lett.*, **1979**, 102, 227.
- [76] Sabra M.C., Jorgensen K., Mouritsen O.G., *Biochim. Biophys. Acta*, **1995**, 1233, 89.
- [77] Inoue T., Miyakawa K., Shimozaawa R., *Chem. Phys. Lipids*, **1986**, 42, 261.
- [78] Jain M. K., Wu N. M., *J. Membrane Biol.*, **1977**, 34, 157.
- [79] McMullen T. P. W., McElhaney R. N., *Biochim. Biophys. Acta*, **1995**, 1234, 90.
- [80] Allen R. D., Travis J.F., Allen N.S., Yilmaz H., *Cell Motil.*, **1981**, 1, 291.

- [81] Allen R. D., Travis J. F., Allen N. S., Yilmaz H., *Cell Motil.*, **1981**, 1, 275.
- [82] Inoué S. *Video Microscopy*; Plenum: New York, **1986**.
- [83] Allen R. D., Weiss D. G., *Spektrum der Wissenschaft*, **1987**, 4, 76.
- [84] Kachar B., Evans D. F., Ninham B. W., *J. Colloid Interface Sci.*, **1984**, 100, 287.
- [85] Salmon E.D., *Proc. 50th annual meeting of the electron microscopy society of america*, **1992**, 414.
- [86] Shotton D. M., *J. Cell. Sci.*, **1988**, 89, 129.
- [87] Brochard F., Lennon J. F., *J. Phys.*, **1975**, 11, 1035.
- [88] Helfrich W., *Z. Naturforsch.*, **1973**, 28c, 693.
- [89] Evans E., Rawicz W., *Phys. Rev. Lett.*, **1990**, 64, 17, 2094.
- [90] Needham D., Evans E., *Biochem.*, **1988**, 27, 8261.
- [91] Faucon J. F., Mitov M. D., Méléard P., Bivas I., Bothorel P., *J. Phys. France*, **1989**, 50, 2389.
- [92] Fernandez-Puente L., Bivas I., Mitov M. D., Méléard P., *Europhys. Lett.*, **1994**, 3, 28, 181.
- [93] Kummrow M., Helfrich W., *Phys. Rev. A*, **1991**, 44, 8356.
- [94] Do Carmo *Differentialgeometrie von Kurven und Flächen*, 3.Auflage, Vieweg Weinheim, **1993**.
- [95] Niggemann G., Kummrow M., Helfrich W., *J. Phys. II*, **1995**, 5, 413.
- [96] Evans E., Needham D., *J. Phys. Chem.*, **1987**, 91, 4219.
- [97] Bo L., Waugh R. E., *Biophys. J.*, **1989**, 55, 509.
- [98] Safinya C. R., Sirota E. B., Roux D., Smith G. S., *Phys. Rev. Lett.*, **1989**, 62, 10, 1134.
- [99] Schneider M. B., Jenkins J. T., Webb W. W., *J. Phys.*, **1984**, 45, 1457.
- [100] Bivas I., Hanusse P., Bothorel P., Lalanne J., Aguerre-Chariol O., *J. Phys.*, **1987**, 48, 855.
- [101] Schneider M. B., Jenkins J. T., Webb W. W., *Biophys. J.*, **1984**, 45, 891.
- [102] Milner S. T., Safran S. A., *Phys. Rev. A*, **1987**, 36, 9, 4371.
- [103] Arfken G. B., Weber H. J. *Mathematical Methods for Physicists*, 4. Edition ; Academic Press: San Diego, **1995**.
- [104] Brenig W. *Statistische Theorie der Wärme*; Springer Verlag, **1975**.
- [105] Bivas I., Bilvolarski L., Mitov M. D., Derzhanski A., *J. Phys. II France*, **1992**, 2,
- [106] Engelhardt H., Duwe H. P., Sackmann E., *J. Physique Lett.*, **1985**, 46, L-395.
- [107] Mitov M. D., Faucon J. F., Méléard P., Bothorel P. *Advances in supramolecular chemistry. A research annual In: Thermal fluctuations of membranes*; Gokel G. W. (Hrsg.); JAI Press Inc.: Greenwich, Conneticut, **1992**; Vol. 2; S. 93.
- [108] Méléard P., Mitov M. D., Faucon J. F., Bothorel P., *Europhys. Lett.*, **1990**, 11, 355.

- [109] Norppa N., Sorsa M., Pfäffli P., Vainio H., *Carcinogenesis*, **1980**, *1*, 357.
- [110] Evans E. A., Waugh R., Melnik L., *Biophys. J.*, **1976**, *16*, 585.
- [111] Méléard P., Faucon J. F., Mitov M. D., Bothorel P., *Europhys. Lett.*, **1992**, *19*, 267.
- [112] Liu H. K., *CGIP*, **1977**, *6*, 123.
- [113] Häckl W., Seifert U., Sackmann E., *J. Phys. II*, **1997**, *7*, 1141.
- [114] Méléard P., Gerbeaud C., Pott T., Fernandez-Puente L., Bivas I., Mitov M. D., Dufourcq J., Bothorel P., *Biophys. J.*, **1997**, *72*, 2616.
- [115] Duwe H. P., Engelhardt H., Zilker A., Sackmann E., *Mol. Cryst. Liq. Cryst.*, **1987**, *1*, 152.
- [116] Szleifer I., Kramer D., Ben-Shaul A., Gelbart W. M., Safran S. A., *J. Chem Phys.*, **1990**, *11*, 92, 6800.
- [117] Yeung A., Evans E., *J. Phys. II*, **1995**, *5*, 1501.
- [118] Duwe H. P., Sackmann E., *Physica A*, **1990**, *163*, 410.
- [119] Duwe H. P., Käs J., Sackmann E., *J. Phys. France*, **1990**, *51*, 945.
- [120] Katz Y., Diamond J. M., *J. Membrane Biol.*, **1974**, *17*, 69.
- [121] Antunes-Madeira M. C., Madeira V. M. C., *Biochim. Biophys. Acta*, **1989**, *982*, 161.
- [122] Gusev D. G., Vasilenko I. A., Evstigneeva R. P., *Bio. Mem.*, **1990**, *3*, 1038.
- [123] Rigaud J. L., Gary-Bobo C. M., Sanson A., Ptak M., *Chem. Phys. Lipids*, **1977**, *18*,
- [124] Seifert U., *Z. Phys. B*, **1995**, *97*, 299.
- [125] Pippard A. B., *Philos. Mag.*, **1956**, *1*, 473.
- [126] MacKintosh F. C., Safran S. A., *Phys. Rev. E.*, **1993**, *47*, 1180.
- [127] Taniguchi T., Kawasaki K., Andelman D., Kawakatsu T., *J. Phys. II France*, **1994**, *4*, 1333.
- [128] Evans E., Needham D., *Faraday Discuss. Chem. Soc.*, **1986**, *81*, 267.
- [129] Bailey S. M., Chiruvolu S., Israelachvili J. N., Zasadzinski J. A. N., *Langmuir*, **1990**, *6*, 1326.
- [130] Helfrich W. *Elasticity and thermal undulations of fluid films of amphiphiles* In: *Liquids at Interfaces*; Joanny J. F., Zinn-Justin J., Charvolin J. (Hrsg.); North-Holland: Amsterdam, **1990**.
- [131] Miller C. A., Raney K. H., *Colloids Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, **1993**, *74*, 169.
- [132] Koch R. *Umweltchemikalien Physikalisch-chemische Daten, Toxizität, Grenz-und Richtwerte, Umweltverhalten*, 3. Auflage ; VCH: Weinheim, **1995**.
- [133] Gustafson K. E., Dickhut R. M., *J. Chem. Eng. Data*, **1994**, *39*, 281.
- [134] Maxwell I.A., Kurja, J., *Langmuir*, **1995**, *11*, 1987.

- [135] Gruen D. W. R., *Biophys. J.*, **1981**, 33, 149.
- [136] Tajima K., Imai Y., Nakamura A., Koshinuma M., *Colloids Surfaces A*, **1999**, 155,
- [137] Sackmann E., Feder T., *Mol. Mem. Biol.*, **1995**, 12, 21.
- [138] Vaz W. L. C. *Consequences of phase separations in membranes* In: *Handbook of Nonmedical Applications of Liposomes*; Lasic D. D., Barenholz Y. (Hrsg.); CRC Press: Boca Raton, **1996**; Vol. II, Kapitel 3; S. 51.
- [139] Leibler S., Andelmann D., *J. Phys. France*, **1987**, 48, 2013.
- [140] Sackmann E., *Can. J. Phys.*, **1990**, 68, 991.
- [141] Lipowsky R., *J Phys. II (France)*, **1992**, 2, 1825.
- [142] Benvegnu D. J., McConnell H. M., *J. Phys. Chem.*, **1992**, 96, 6820.
- [143] Mountford C. E., Wright L. C., *Trends Biochem. Sci.*, **1988**, 13, 172.
- [144] Carroll B. J., *J. Colloid Interface Sci.*, **1981**, 1, 79, 126.
- [145] Chen B.-H., Miller C. A., Garrett P. R., *Langmuir*, **1998**, 1, 14, 31.
- [146] Shaeiwitz J. A., Chan A. F.-C., Cussler E. L., Evans D. F., *J. Colloid Interface Sci.*, **1981**, 1, 84, 47.
- [147] Ward A. J. *Kinetics of Solubilization in Surfactant-Based Systems* In: *Solubilization in Surfactant Aggregates*; Scamehorn J. F., Christian S. D. (Hrsg.); Marcel Dekker: New York, **1995**, Kapitel 7.
- [148] Chen B.-H., Miller C. A., Garrett P. R., *Colloids Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, **1997**, 128, 129.
- [149] Thust R., Gräbner R., *Mutat. Res.*, **1984**, 139, 207.
- [150] de Raat W. K., *Chem.- Biol. Interactions*, **1978**, 20, 163.
- [151] Morris, S. M., *Mutat. Res.*, **1991**, 258, 161.
- [152] Hemminki K., Falck K., Linnainmaa K., *J. Appl. Tox.*, **1983**, 4, 203.
- [153] Phillips B. J., James T. E. B., *Mutat. Res.*, **1982**, 100, 263.
- [154] von der Hude W., Carstensen S., Gürtler R., Obe G., *Mutat. Res.*, **1992**, 278, 289.
- [155] Natarajan A. T., Csukas I., van Zeeland A. A., *Mutat. Res.*, **1981**, 84, 125.
- [156] Nishio A., Uyeki E. M., *J. Toxicol. Environ. Health*, **1981**, 8, 939.
- [157] Darroude F., Natarajan A. T., *Medical research council, SCE Assay*, **1985**, 149, 239.
- [158] Straubinger R. M., Hong K., Friend D. S., Papahadjopoulos D., *Cell*, **1983**, 32, 1069.
- [159] Weinstein J. N., Yoshikama S., Henkart P., Blumenthal R., Hagins W. A., *Science*, **1977**, 489.
- [160] Chen H., Langer R., Edwards D. A., *J. Colloid Interface Sci.*, **1997**, 190, 118.
- [161] Huang J., Bubholtz J. T., Feigenson G. W., *Biochim. Biophys. Acta*, **1999**, 1417, 89.

- [162] Döbereiner H.-G., Selchow O., Lipowsky R., *Eur. Biophys. J.*, **1999**, 28, 174.
- [163] VanderMeulen D. L., Misra P., Michael J., Spears K. G., Khoka M., *Photochem. Photobiol.*, **1992**, 56, 325.
- [164] Bar-Ziv R., Moses E., *Phys. Rev. Lett.*, **1994**, 73, 1392.
- [165] Ringsdorf H., Schlarb B., Venzmer J., *Angew. Chem.*, **1988**, 100, 117.
- [166] Hotz J., Meier W., *Adv. Mater.*, **1998**, 10, 1387.
- [167] Chen H., Langer R., *Adv. Drug Delivery Rev.*, **1998**, 34, 339.
- [168] Torchilin V. P., Klibanov A. L., Ivanov N. N., Ringsdorf H., Schlarb B., *Makromol. Chem. Rapid Commun.*, **1987**, 8, 457.
- [169] Borden K. A., Eum K. M., Langley K. H., Tirrell D. A., *Macromolecules*, **1987**, 20, 454.
- [170] Hotz J., Meier W., *Langmuir*, **1998**, 14, 1031.
- [171] Murtagh J., Thomas J. K., *Faraday Discuss. Chem. Soc.*, **1986**, 81, 127.
- [172] Kurja J., Nolte R.J. M., Maxwell I. A., German A. L., *Polymer*, **1993**, 34, 2045.
- [173] Jung M., Hubert D. H. W., Bomans P. H. H., Frederik P. M., Meuldijk J., van Herk A. M., Fischer H., German A. L., *Langmuir*, **1997**, 13, 6877.

11 Anhang

11.1 Ermittelte chemische Verschiebungen

Tabelle 11-1: Auflistung und Zuordnung der chemischen Verschiebungen der Protonenresonanzen von DMPC-Vesikeln (SUV) in D₂O nach Einlagerung unterschiedlicher Substanzen in Konzentrationen im Bereich maximaler Solubilisierungskapazität der Vesikel. Die Messungen erfolgten bei 25°C und einer Meßfrequenz von 200 MHz.

DMPC	DMPC/ Phenol	DMPC/ Benzol	DMPC/ Toluol	DMPC/ Styrol	Zuordnung
δ [ppm]	δ [ppm]	δ [ppm]	δ [ppm]	δ [ppm]	
	7.39-7.32	7.43	6.95-6.82	7.22-7.12 5.70-5.60 5.18-5.11	CH (aromat.) CH ₂ (Styrol) CH (Styrol) CH ₃ (Toluol)
			2.00		
5.35	5.34	5.33	5.35	5.35	CHOCO
4.50	4.45	4.45	4.50	4.50	CH ₂ OCO
4.36	4.28	4.30	4.32	4.32	CH ₂ CH ₂ N ⁺
4.18	4.15	-	4.20	4.19	CH ₂ OP
3.76	3.67	3.65	3.70	3.71	CH ₂ N ⁺
3.30	3.26	3.22	3.26	3.28	N ⁺ (CH ₃) ₃
2.45	2.33	2.35	2.33	2.35	CH ₂ COO
1.60	1.60	1.50	1.50	1.45	CH ₂ CH ₂ COO
1.32	1.36	1.16	1.15	1.15	(CH ₂) ₄₋₁₃
0.92	0.95	0.76	0.77	0.79	CH ₃

11.2 Liste der verwendeten Chemikalien

Substanz	Firma
3-Aminobenzamid	Avocado, Karlsruhe
5-Bromdesoxyuridin (BrdUrd)	Serva, Heidelberg
Colcemid	Ciba, Basel
Ethylmethansulfonat	Merck, Darmstadt
Fötale Kälberserum	Gibco/BRL, Eggenstein
Giemsa-Farbstofflösung	Merck, Darmstadt
Hoechst 33258 (Bisbenzimid)	Boehringer, Mannheim
McCoy's 5A Medium	Gibco, Eggenstein
Penicillin	Hoechst, Frankfurt a. M.
Phosphatpuffer	Seromed, Berlin
S9-Mix	ICN, Biomedicals
Trypsin/EDTA	Seromed, Berlin
(1R,2R)-(+)-1-Phenyl-1,2-Epoxypropan	Merck, Darmstadt

Alle nicht aufgeführten Chemikalien wurden von der Firma Fluka, Biochemika bezogen.